

**IMMOBILISIERUNG VON ENZYMEN DURCH KOVALENTE
BINDUNG AN WASSERLÖSLICHE REAKTIVE COPOLYMERE
DES N-VINYLPYRROLIDONS**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Chemie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Stefan Heise
aus Berlin

1984



IMMOBILISIERUNG VON ENZYMEN DURCH KOVALENTE
BINDUNG AN WASSERLÖSLICHE REAKTIVE COPOLYMERE
DES N-VINYLPYRROLIDONS

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Chemie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Stefan Heise
aus Berlin

1. Gutachter: Prof. Dr. G. Manecke

2. Gutachter: Prof. Dr. Koßmehl

Tage der mündlichen Prüfungen:

Organische Chemie	13.3.1984
Anorganische Chemie	16.3.1984
Biochemie	27.3.1984

Diese Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Manecke am Institut für Organische Chemie der Freien Universität Berlin angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Lehrer Herrn Prof. Dr. G. Manecke für die Anregung zu dieser Arbeit und sein stetes Interesse an ihr sowie für die jederzeit gewährte Unterstützung und Förderung ihrer Durchführung.

Mein Dank gilt weiterhin den Damen und Herren der Spektrenabteilungen und der Analysenabteilungen, den zahlreichen weiteren Kollegen der Materialverwaltung und der Arbeitsgruppe, sowie Herrn Leopold und Herrn Dr. Plewinsky für die Durchführung der Ultrazentrifugenmessungen und die Diskussion der Ergebnisse.

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
1.1 Einleitung	5
1.2 Aufgabenstellung.....	9
2. Spezieller Teil	11
2.1 Wasserlösliche reaktive Copolymere des N-Vinylpyrrolidons	11
2.1.1 Copolymer aus N-Vinylpyrrolidon und Acrylsäure (Träger 1)	11
2.1.2 N-Vinylpyrrolidon/Acrylsäure-Copolymer (Träger 1), verestert mit N-Hydroxysuccinimid (Träger 2a)	12
2.1.3 N-Vinylpyrrolidon/Acrylsäure-Copolymer (Träger 1), umgesetzt mit Triäthylentetramin (Träger 2b)	15
2.1.4 Copolymere aus N-Vinylpyrrolidon und Vinylalkohol (Polymere 3 - 5).....	18
2.1.4.1 Vinylalkoholhaltige Copolymere mit aromatischen Amino- gruppen (Träger 4a - c)	22
2.1.4.2 Vinylalkoholhaltige Copolymere, verestert mit p-Aminosalicylsäure (Träger 5a - c)	24
2.1.5 Copolymere aus N-Vinylpyrrolidon und Acrylsäureäthyl- ester (Polymere 6a - c) und deren Umsetzung zu den Säurehydraziden (Träger 6a - c)	26
2.1.6 Copolymer aus N-Vinylpyrrolidon und p-Aminostyrol (Träger 7)	29
2.2 Enzyme, kovalent gebunden an wasserlösliche reaktive Polymere	34
2.2.1 Konjugate aus Träger 1 und Trypsin (PT 1 - PT 29)	34
2.2.1.1 Kupplung von Trypsin an Träger 1	34
2.2.1.2 Isolierung und Reinigung der Konjugate	37
2.2.1.3 Prüfung der Konjugate auf Reinheit	41
2.2.1.4 Charakterisierung der Konjugate	43
2.2.1.4.1 Bestimmung des Eiweißgehaltes	43
2.2.1.4.2 Bestimmung der enzymatischen Aktivität	46
2.2.1.4.3 pH-Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität	52
2.2.1.4.4 Untersuchung der Lagerstabilität der (Träger 1/Trypsin)- Konjugate	55
2.2.1.4.5 Untersuchung der Thermostabilität der (Träger 1/ Trypsin)-Konjugate	57

	<u>Seite</u>
2.2.1.4.6 Betrieb von diskontinuierlichen und kontinuierlichen Enzymreaktoren	63
2.2.1.4.7 Bestimmung der Molmassen von (Träger 1/Trypsin)-Konjugaten mit Hilfe der Ultrazentrifuge	68
2.2.1.5 Umsetzung von Trypsin mit Carbodiimid	73
2.2.2 Konjugate aus Träger 2a und Trypsin (PT 30 - PT 33)...	74
2.2.2.1 Herstellung und Isolierung der (Träger 2a/Trypsin)-Konjugate	74
2.2.2.2 Eigenschaften der (Träger 2a/Trypsin)-Konjugate	76
2.2.3 Konjugate aus Träger 2b und Trypsin (PT 34 - PT 37) ..	78
2.2.4 Trypsinhaltige Konjugate aus den Trägern 6a - 6c und Trypsin (PT 38 - PT 46)	79
2.2.5 Konjugate aus Träger 1 und Peroxidase (PP 1 - PP 10) .	81
2.2.5.1 Peroxidase	81
2.2.5.2 Kupplung von Peroxidase an Träger 1 (PP 1 - PP 10)	83
2.2.5.3 Isolierung und Reinigung der Konjugate aus Träger 1 und Peroxidase	84
2.2.5.4 Bestimmung des Eiweißgehaltes	88
2.2.5.5 Bestimmung der Aktivität von (Träger 1/POD)-Konjugaten	90
2.2.5.6 Untersuchung der Thermostabilität der (Träger 1/POD)-Konjugate	92
2.2.5.7 Umsetzung von POD mit Carbodiimid	94
2.2.6 Konjugate aus Träger 4a und Peroxidase	94
2.2.6.1 Kupplung und Isolierung	94
2.2.6.2 Versuche zur Bestimmung des Eiweißgehaltes des Konjugates PP 11	96
2.2.7 Konjugate aus den Trägern 5a - 5c und Peroxidase	98
2.2.8 Untersuchung der Beständigkeit verschiedener POD-haltiger Konjugate gegenüber Wasserstoffperoxid	99
2.2.9 Konjugate aus Träger 7 und POD	101
2.2.10 Konjugate aus Träger 1 und Aminoacylase	102
2.2.10.1 Aminoacylase	102
2.2.10.2 Kupplung und Reinigung der (Träger 1/Aminoacylase)-Konjugate	104
2.2.10.3 Eigenschaften der (Träger 1/Aminoacylase)-Konjugate ..	105
2.2.11 Konjugate aus Träger 4a und Aminoacylase	108
2.2.12 Konjugate aus Träger 7 und Aminoacylase	108

	<u>Seite</u>
3. Experimenteller Teil	109
4. Zusammenfassung	138
5. Literaturverzeichnis	149

1.1 Einleitung

Enzyme sind hochaktive Biokatalysatoren. Sie greifen entscheidend in die physiologischen Vorgänge ein. Die Enzyme zeigen eine sehr hohe Aktivität und Spezifität auf. Diese werden von den in der Industrie angewendeten Katalysatoren nicht erreicht. Die Aktivität und Spezifität der Enzyme sind von ihrer Struktur abhängig. Die Struktur der isolierten Enzyme ist jedoch meist nicht stabil. Für die industrielle Anwendung ist dieser Umstand sehr nachteilig. Weitere Nachteile für die industrielle Nutzung der Enzyme sind oft ihre schwierige Gewinnung und damit ihr hoher Preis. Diese Nachteile haben sich hemmend auf die Verbreitung ihrer technologischen Nutzung ausgewirkt.

Der Durchbruch für die Nutzung der Enzyme als industrielle Katalysatoren wurde dadurch erreicht, daß es gelang, Enzyme an unlösliche polymere Träger zu binden. Pionierarbeiten bei der Immobilisierung von Enzymen wurden in Deutschland von G. Manecke geleistet. Schon 1955 wurde über diazotiertes Poly-(p-aminostyrol) mit kovalent gebundenen Antikörpern und Antigenen als spezifisches Adsorbens berichtet (1). Eine Vielzahl von Veröffentlichungen folgte (2, 3, 4).

Inzwischen ist der Einsatz immobilisierter Enzyme weit verbreitet. Der Anfang der industriellen Nutzung wurde in Japan gemacht (5). Hier hat I. Chibata unter Verwendung immobilisierter Enzyme die Produktion von L-Aminosäuren durchgeführt. Weitere wichtige Anwendungen sind die Isomerisierung der durch Stärkehydrolyse gewonnenen Glucose zu einem stark fructosehaltigen Sirup und die Herstellung der 6-Aminopenicillansäure für die Darstellung halbsynthetischer Penicilline. Einen Überblick über die technischen Anwendungen geben B.P. Sharma et al. (6).

Für die Immobilisierung von Enzymen gibt es mehrere Möglichkeiten. Sie kann durch kovalente Bindung, durch Adsorption oder durch Einschluß in Polymernetzwerke erfolgen. Als Träger für die Adsorption und die kovalente Bindung kommen sowohl natürliche und synthetische organische Polymere als auch anorganische Stoffe wie z.B. poröses Glas in Frage. Die Vorteile bei der Anwendung immobilisierter Enzyme sind ihre leichte Abtrennbarkeit von der Substrat- bzw. Produktlösung und ihre Wiederverwendbarkeit. Dadurch wird



der Einsatz auch teurerer Enzyme wirtschaftlich interessant. Der Einsatz in kontinuierlichen Verfahren wird möglich. Außerdem wird in vielen Fällen eine Stabilisierung der Enzyme durch die Immobilisierung beobachtet.

Ein weiterer wesentlicher Fortschritt in Richtung ausgiebiger industrieller Nutzung enzymatischer Reaktionen war die Vereinfachung der Enzymgewinnung durch die Affinitätschromatographie.

Unlösliche reaktive Polymere wurden nicht nur zur kovalenten Bindung von Enzymen eingesetzt. Es soll hier auch auf ihre Anwendung als Träger für Festkörpersynthesen und als Träger organischer Reagenzien und Katalysatoren hingewiesen werden. Der Vorteil von Festkörpersynthesen ist besonders bei deren Anwendung zur Peptidsynthese nach R.B. Merrifield (7) bekannt geworden. Vorteile polymerer Reagenzien sind wiederum ihre leichte Abtrennbarkeit aus der Reaktionsmischung, sie sind im Überschuß einsetzbar, dadurch läßt sich die Ausbeute an gewünschtem Produkt erhöhen. Fixiert an Polymere verlieren giftige oder übelriechende Reagenzien diese Nachteile und werden ohne besondere Vorsichtsmaßnahmen einsetzbar. Außerdem lassen sich Spezifität und Selektivität der polymer gebundenen Reagenzien durch die Wahl eines geeigneten Trägers beeinflussen.

Als Nachteile unlöslicher reaktiver Polymerer müssen allerdings die in den reaktiven Partikeln auftretenden Hemmungen der Umsetzungen durch Diffusionsbehinderung in Kauf genommen werden. In manchen Fällen kann auch eine nur teilweise Nutzung der reaktiven Gruppen des Polymeren durch sterische Behinderung erfolgen. Diese Nachteile entstehen, weil hier die Umsetzungen in fester Phase ablaufen. Dies gilt auch für die Herstellung und Anwendung der Immobilisate aus unlöslichen Trägern und Enzymen.

Die erwähnten Nachteile versucht man zu umgehen, indem man lösliche "Immobilisate" anwendet. Man stellt sie durch Umsetzung von löslichen reaktiven Polymeren mit Enzymen zu löslichen Enzym-Polymer-Konjugaten her. Die für die Bindung von Enzymen normalerweise notwendige Löslichkeit der Polymeren in Wasser schränkt die Anzahl der möglichen reaktiven Träger stark ein. Auch unter den wasserlöslichen Polymeren gibt es keine universell einsetzbaren Träger. Polymer, Enzym und Reaktionsbedingungen müssen aufeinander abgestimmt sein.

Ebenso wie die unlöslichen polymeren Träger wurden lösliche Polymere als Träger für Synthesen (8, 9), Enzyme, Katalysatoren (10), Komplexbildner (11) und für Pharmaka hergestellt (12). Auch wurden lösliche Polymere mit katalytischen Eigenschaften, die sogenannten Synzyme, beschrieben. So wurde oft z.B. über lösliche polymere Sulfonsäuren, die Hydrolysen beschleunigen können, berichtet (13). Als Überblick über dieses Gebiet sei hier die Veröffentlichung von T. Okube und N. Ise erwähnt (14).

Während unlösliche immobilisierte Enzyme in großer Zahl beschrieben worden sind und es über diese etliche umfassende Übersichtsartikel gibt (3, 4, 6, 15, 16), ist über lösliche Enzym-Polymer-Konjugate relativ wenig berichtet worden. Sie nehmen eine Zwitterstellung zwischen unlöslichen Immobilisaten und den freien nativen Enzymen ein. Sie sind noch löslich in Wasser und damit recht frei beweglich, was ähnlich den nativen Enzymen eine gute Aktivität auch gegenüber hochmolekularen Substraten erwarten läßt, sie sind aber andererseits schlecht zu isolieren. Die schlechte Abtrennbarkeit aus Lösungen und Reaktionsansätzen - verglichen mit unlöslichen Immobilisaten - und die daraus resultierenden wesentlich aufwendigeren Methoden der Reinigung der löslichen Konjugate mögen ein Grund dafür sein, weshalb sie nur wenig Beachtung gefunden haben. Die üblichen Aufarbeitungsverfahren arbeiten mit Fällung, Gelfiltration, Ultrafiltration und Dialyse.

Die Reaktion der löslichen reaktiven Polymeren mit den Enzymen wird durch die Anzahl und Lage der reaktiven Gruppen auf der Polymerkette beeinflusst. Sie wird ebenfalls beeinflusst durch die Konzentrationen und das Verhältnis der Konzentrationen der Reaktionspartner, durch das Lösungsmittel und den pH-Wert. In den meisten Fällen findet die Kupplung der Enzyme über die ϵ -Aminogruppen des Lysins, über die Carboxylgruppen von Glutamin- und Asparaginsäure oder auch über die für elektrophile Substitutionen aktivierten aromatischen Systeme wie im Tyrosin statt. Je nach Art des Polymeren wird das Enzym nur an einer einzigen Stelle gebunden oder es finden durch Mehrfachbindung intra- und intermolekulare Vernetzungen statt, die unter Umständen in ungünstigen Fällen zu unlöslichen Produkten führen können.

Derartige modifizierte Enzyme können in Membranreaktoren eingesetzt werden. Je größer das Enzym-Polymer-Konjugat ist, desto größer können die Poren der Membranen sein, was dann wiederum höhere Durchflußgeschwindigkeiten in den Membranreaktoren erlaubt. Daher ist eine kovalente Bindung an lösliche Polymere besonders bei Enzymen mit kleinen Molmassen lohnend. Daneben wurde auch schon versucht, die kovalente Bindung zu vermeiden, da die Reaktion mit den reaktiven Trägern in fast allen Fällen zu Aktivitätsverlusten führt. So wurden die Enzyme an Membranen nur adsorbiert oder in Membranen eingeschlossen (17, 18).

Zur Bindung von Enzymen wurden vielfach Polysaccharide eingesetzt. Die erste Veröffentlichung über lösliche Enzym-Polymer-Konjugate, Proteasen an Cellulosederivate gebunden, stammt von M.A. Mitz und L.J. Summari (19). R. Axén et al. nutzten die Vorteile unlöslich immobilisierter Enzyme durch Bindung von Chymotrypsin an Dextran. Letzteres wurde anschließend enzymatisch hydrolysiert und damit löslich gemacht (20). J.R. Wykes et al. verknüpften Amylase mit Cellulosederivaten (21) und S.P. O'Neill et al. beschrieben einen Ultrafiltrationsreaktor mit cellulosegebundenem Chymotrypsin (22). L. Kågedal und S. Åkerström kuppelten mit Cyanbromid Glycin, Ampicillin und Insulin an Dextran (23). G. Vegarud und T.B. Christensen banden an Dextran Hydrolasen mit dem gleichen Reagenz (24). B.M. Kurinenko et al. setzten Polysaccharide zur Bindung von Nucleasen ein (25, 26). Catalase wurde von J.J. Marshall et al. (27, 28) und Trypsin von G.M. Lindenbaum et al. (29) an Dextran gebunden. R.L. Foster beschrieb ein Polyaldehyddextran, mit dem er ebenfalls Trypsin verknüpfte (30). R.R. Reiner und H. Doring kuppelten verschiedene Oxidoreduktasen und Hydrolasen an teilweise oxidiertes Dextran (31). H.F. Pfeiffer et al. erhielten mit einem Aldehydgruppen enthaltenden Polysacharid erst ein unlösliches Konjugat, das durch Reduktion löslich wurde (32).

Auch Polyäthylenglykol wurde zur Kupplung von Catalase (33, 34), Arginase und Uricase eingesetzt (35). Enzyme, die an Copolymere des Acrylamid gebunden waren, wurden ebenfalls mehrfach beschrieben (26, 37). Berichtet wurde auch über Polyvinylpyrrolidon (38-40), ein Acrylsäure-Acrolein-Copolymer (41), derivatisiertes Polyäthylenimin (14, 42) und über Äthylen-Maleinsäure-Copolymere (43, 44) als Träger für Enzyme. So wurde Amyloglucosidase kovalent an das zuletzt erwähnte Polymer gebunden. Das Produkt

wurde dann an DEAE-Cellulose adsorbiert (44). R.P. Patel et al. (45) konnten mit Polyacrylsäure verknüpftes Chymotrypsin bei tiefen pH-Werten reversibel ausfällen. Erst kürzlich beschrieben wurde ein Trypsin-Kallikrein-Inhibitor kovalent gebunden an ein polymeres Asparaginsäureamid, das in den Seitenketten aromatische Aminogruppen enthielt (46).

Neben Enzymen sind auch verschiedentlich Coenzyme an wasserlösliche Polymere gebunden worden (47-53). So wurde makromolekular gebundenes NAD sowohl zusammen mit unlöslich immobilisierter Alkoholdehydrogenase (53) als auch mit nativer Lactatdehydrogenase eingesetzt (52). Im letzteren Fall wurde das NADH durch Photooxidation regeneriert. An Algininsäure gebundene Nicotinamid-Coenzyme waren pH-abhängig reversibel ausfällbar (49). Auch Dextran wurde zur Coenzym-Bindung verwendet (47, 51).

Zwischen löslichen und unlöslichen immobilisierten Enzymen stehen solche Konjugate, die durch Reaktionen von Enzymen mit reaktiven Mikrogelen mit Durchmessern bis ungefähr 50 nm gebildet werden können (54).

Nicht nur die kovalente Bindung an Polymere verändert die Eigenschaften der Enzyme, auch schon die bloße Anwesenheit von Polymeren kann dies bewirken. Während bei den in der Diplomarbeit beschriebenen Polymeren und Enzymen keine Effekte beobachtet worden sind (55), stellten T. Keleti et al. bei ihren Untersuchungen Änderungen der enzymatischen Aktivität fest (56).

Bei den wasserlöslichen polymergebundenen Enzymen wurde vielfach eine verbesserte Stabilität gegen Hitzedenaturierung und bei Lagerung beobachtet. Dies wird durch die Fixierung der Enzymtertiärstruktur durch die Polymerkette bewirkt. Daneben bietet das Polymer auch einen gewissen Schutz gegen den Angriff von Proteasen.

1.2. Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit sollten, als Fortsetzung der Diplomarbeit, verschiedene wasserlösliche reaktive Copolymere des N-Vinylpyrrolidons zur kovalenten Bindung von Enzymen dargestellt werden. Ging man von Copolymeren

des N-Vinyl-pyrrolidon aus, die keine reaktiven Gruppen enthielten, so wurden diese nachträglich durch polymeranaloge Umsetzung eingeführt. Polyvinylpyrrolidon ist ein auch bei hohen Molekulargewichten noch gut lösliches Polymer, so daß die Verwendung des N-Vinyl-pyrrolidons eine brauchbare Wasserlöslichkeit der Copolymerisate erwarten ließ.

Untersucht werden sollte die Bindung von drei Enzymen an die jeweiligen reaktiven Polymeren und die Eigenschaften der dabei entstandenen löslichen Immobilisate.

Insbesondere sollte dabei untersucht werden, in welchem Ausmaße sich die Lager- und die Thermostabilität der Enzyme durch die Umsetzung mit den Polymeren verbessern lassen.

Die Verwendung der Protease Trypsin erlaubt ein besonders leichtes Erkennen der Stabilisierung durch die Bindung an Polymere, da neben der Einwirkung von Denaturierungsfaktoren wie Hitze oder pH-Wert auch Autolyse möglich ist. Aminoacylase ist ein großtechnisch schon viel genutztes Enzym zur Herstellung reiner Enantiomere von Aminosäuren. Die Peroxidase schließlich hat als ein Hydroxylierungen katalysierendes Enzym einiges Interesse gefunden.

2. Spezieller Teil

2.1. Wasserlösliche reaktive Copolymere des N-Vinylpyrrolidons

2.1.1. Copolymer aus N-Vinylpyrrolidon und Acrylsäure (Träger 1)

Copolymere aus N-Vinylpyrrolidon (NVP) und Acrylsäure (AS) wurden schon in der Diplomarbeit (55) zur Bindung von Papain und Trypsin eingesetzt. Bei Verwendung eines wasserlöslichen Carbodiimids als Kupplungskomponente wurde eine große Menge Enzym gebunden. Ein weiteres Copolymer (Träger 1) mit einem etwas höheren Molekulargewicht wurde nach H. Uelzmann (57) dargestellt. Dazu wurden die beiden Monomeren im Molverhältnis 4 zu 1 (NVP/AS) in Tetrahydrofuran mit Dibenzoylperoxid als Initiator am Rückfluß gekocht. Ein höherer NVP-Gehalt als bei den schon beschriebenen Copolymeren wurde auch in diesem Fall entgegen den Resultaten von H. Uelzmann nicht gefunden.

Die Zusammensetzung von Träger 1 wurde sowohl durch Titration der Carboxylgruppen mit Natronlauge als auch durch den elementaranalytisch bestimmten Stickstoffgehalt ermittelt. Bei der Berechnung des zu erwartenden Stickstoffgehaltes des Copolymerisates aus dem titrimetrisch bestimmten Gehalt an Carboxylgruppen wurde ein deutlich höherer Stickstoffgehalt errechnet, als er durch die Elementaranalyse gefunden wurde. Umgekehrt ergab sich auch bei der Umrechnung des elementaranalytisch bestimmten Stickstoffgehaltes auf den Gehalt an Carboxylgruppen ein höherer Wert für diesen, als er titrimetrisch bestimmt worden war.

Das läßt sich nur dadurch erklären, daß bei dem Träger 1 ein Wassergehalt

Tabelle 1

Zusammensetzung von Träger 1

gef. (Elementaranalyse)	gef. (Titration)
56,55 % C	4,70 mVal COOH/g
6,93 % H	daraus ber. 59,83 % C
7,71 % N	7,30 % H
daraus ber. 5,40 mVal COOH/g	8,35 % N

berechnet für das Copolymer mit der Zusammensetzung

(NVP) 0,43 (AS) 0,39 (H₂O) 0,18 (Copolymer mit 4 Gew% Wasser):

56,99 % C

7,39 % H

7,67 % N

4,86 mVal COOH/g

von 4 Gew% angenommen wird. Dieses Wasser läßt sich nicht ohne weiteres entfernen. Durch Trocknen entferntes Wasser wird sehr schnell wieder aufgenommen. Durch das Einbeziehen des Wassers konnte eine Zusammensetzung des Copolymeren (s. Tabelle 1) berechnet werden, die mit der elementaranalytisch gefundenen gut übereinstimmt. Für das wasserfreie Copolymer wurde ein Gehalt von 53 Mol% NVP und 47 Mol% AS errechnet, so daß man annehmen kann, daß die beiden Monomeren annähernd im Verhältnis 1 : 1 eingebaut worden sind.

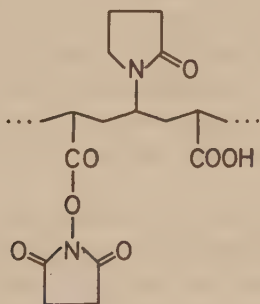
Die Bestimmung der molaren Masse von Träger 1 wurde sowohl mit dem Dampfdruckosmometer als auch mit der Ultrazentrifuge durchgeführt. Als störend erwiesen sich dabei die auch nach dem Trocknen des Polymeren noch darin enthaltenen Wasserreste. Die dampfdruckosmotrische Bestimmung der Molmasse des bei der Polymerisation erhaltenen Produktes ergab 4200 g/mol. Dieser Wert stieg nach einer Reinigung durch Membranfiltration auf 7500 g/mol. In der Ultrazentrifuge wurden schließlich 12700 g/mol gefunden. Die Ergebnisse der Messungen in der Ultrazentrifuge sind in Tabelle 12, Kapitel 2.2.1.4.7 zusammengefaßt.

2.1.2. N-Vinylpyrrolidon/Acrylsäure-Copolymer (Träger 1), verestert mit N-Hydroxysuccinimid (Träger 2a)

Werden Enzyme in Gegenwart von Carbodiimid in Lösung an Polymere gebunden, so besteht die Möglichkeit, daß ein Teil des Enzyms nicht mit dem Träger reagiert, sondern daß die Enzymmoleküle untereinander vernetzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit war dieser Effekt unerwünscht. Daher wurde für Vergleiche mit Ansätzen, die alle drei Reaktionskomponenten - Träger, Enzym und Kuppler - enthielten, ein polymerer Träger mit aktivierten Estergruppen hergestellt.

Derartige Ester können z.B. p-Nitrophenylester, N-Hydroxyphthalimidester oder N-Hydroxysuccinimidester sein. Für die Aktivierung der Carboxylgruppen des Trägers 1 wurde N-Hydroxysuccinimid (NHS), das von G.W. Anderson et al. (58) eingeführt worden ist, ausgewählt, weil die NHS-Ester leichter als die anderen aktivierten Ester aminolytisch spaltbar sind.

Zur Darstellung von Polymeren mit NHS-Gruppen können diese durch polymer-analoge Umsetzungen oder durch die Verwendung von Monomeren, die eine aktivierte Estergruppe enthalten, dargestellt werden. Es wurde hier eine polymer-analoge Umsetzung durchgeführt. Dabei war zu erwarten, daß ein Teil der Carboxylgruppen von Träger 1 nicht modifiziert würde, daß also ein saurer Träger erhalten werden würde. Die Umsetzungsprodukte des Trägers 2a mit Enzym würden so den entsprechenden Produkten des Trägers 1, bei denen ebenfalls überschüssige Carboxylgruppen zu erwarten waren, entsprechen.



Die Verknüpfung des NHS mit den Carboxylgruppen des Trägers 1 wurde mit Hilfe von Dicyclohexylcarbodiimid in DMF durchgeführt. Dabei fiel der entstehende Dicyclohexylharnstoff größtenteils aus. Der restliche Harnstoff konnte leicht durch geeignete organische Lösungsmittel, in denen das Polymere unlöslich ist, entfernt werden.

Das IR-Spektrum des Trägers 2a ähnelt sehr demjenigen von Träger 1 (s. Kapitel 2.1.3.). Neue charakteristische Peaks erscheinen bei 1815 cm^{-1} , 1790 cm^{-1} und 1745 cm^{-1} neben einigen neuen Peaks im Fingerprintbereich.

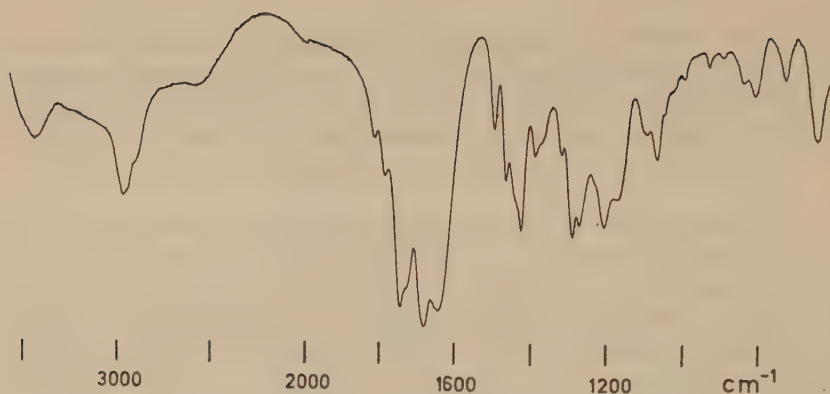
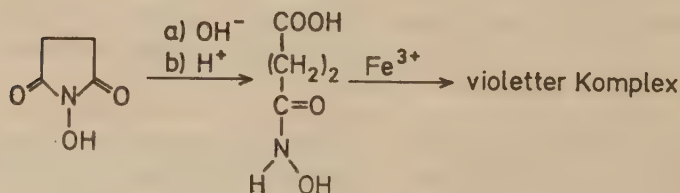


Abb. 1: IR-Spektrum von Träger 2a (KBr-Preßling)

Die neuen Peaks im Absorptionsbereich von Carbonylgruppen entsprechen in ihrer relativen Intensität und Lage zueinander den drei Carbonylbanden des niedermolekularen Succinimids. Sie sind um ca. 35 cm^{-1} zu größeren Wellenzahlen verschoben. Die Anwesenheit freier Carboxylgruppen wird durch die breite Bande der O-H-Valenzschwingung bei 2580 cm^{-1} angezeigt, die auch bei Träger 1 erscheint, nicht aber bei Polyvinylpyrrolidon.

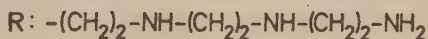
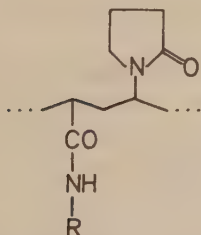
Der Gehalt des Trägers 2a an NHS-gruppen wurde mit Hilfe eines von R.L. Schnaar und Y.Ch. Lee (59) beschriebenen Verfahrens bestimmt. Dabei wird die zu untersuchende Substanz durch Natronlauge hydrolysiert und das entstandene Hydroxamat photometrisch bei 500 nm nach einer Reaktion mit Eisenchlorid bestimmt. Um eine Eichgerade zu erhalten, wurden verschiedene



Proben von freiem NHS ebenso wie das Polymer behandelt. Es wurden 250 μMol Succinimidgruppen pro Gramm Polymer gefunden, entsprechend 29 mg NHS pro Gramm Polymer. Bei einem Gehalt von 4,7 mVal Carboxylgruppen pro Gramm ergibt sich ein Umsetzungsgrad dieser Gruppen von ungefähr 5 %.

2.1.3. N-Vinylpyrrolidon/Acrylsäure-Copolymer (Träger 1), umgesetzt mit Triäthylentetramin (Träger 2b)

Außer mit N-Hydroxysuccinimid wurde Träger 1 auch mit Triäthylentetramin umgesetzt. Zum einen sollten durch diese Umsetzung Spacer in das Polymere eingeführt werden, die Aminogruppen enthielten, um Enzyme über ihre freien Carboxylgruppen binden zu können, zum anderen sollte eine leichte Vernetzung des Polymeren erreicht werden, um höhere molare Massen zu erhalten.



Die Umsetzung ergab ein Polymeres, das primäre und sekundäre Aminogruppen enthielt. Darüber hinaus waren noch überschüssige Carboxylgruppen enthalten, die mit der Kupplungskomponente, dem wasserlöslichen 1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid, nicht reagiert hatten. Aus den bei der Elementaranalyse von Träger 2b erhaltenen Werten ließ sich errechnen, daß ungefähr jede siebente Carboxylgruppe mit dem Amin reagiert hat:

vor Dialyse: gef.: 51,99 % C
 7,41 % H
 9,79 % N

ber.: 52,04 % C
 8,12 % H
 9,81 % N

für (NVP)_{0,30}(AS)_{0,27}(Amin)_{0,04}(H₂O)_{0,39}

(Polymer mit 11 Gew.% Wasser)

nach Dialyse: gef.: 52,96 % C
 7,36 % H
 9,77 % N

Dieses Ergebnis stimmt annähernd mit dem Verhältnis der eingesetzten Mengen an Polymer und Amin überein. Im Ansatz lag ein ca. neunfacher Überschuß an Carboxylgruppen vor, wenn nur eine Seite des zugesetzten Amins reagierte. Dabei wurde eine mögliche Salzbildung zwischen dem sauren Träger 1 und dem Amin nicht berücksichtigt.

Zur Abschätzung, wie groß der Anteil an salzartig gebundenem Amin ist, wurde Träger 2b in salzsaurer Lösung gegen 1 mM Salzsäure dialysiert. Dadurch sollte möglicherweise vorhandenes Aminhydrochlorid abgetrennt werden. Die Elementaranalyse des Trägers ergab nach der Dialyse nur wenig veränderte Werte, was darauf hindeutete, daß nur ein geringer Anteil des Amins salzartig gebunden war. Die Bindungsverhältnisse im Träger 2b wurden nicht näher untersucht, da sich gezeigt hatte, daß er zur Bindung von Enzymen wenig geeignet war (s. Kapitel 2.2.3). Bei der Berechnung der Zusammensetzung von Träger 2b waren wie bei Träger 1 beträchtliche Mengen an Wasser zu berücksichtigen, um eine Übereinstimmung der berechneten Werte des C- und des N-Gehaltes mit den elementaranalytisch gefundenen zu erreichen.

Der Vergleich der IR-Spektren von Träger 1 und von Träger 2b (s.S.17) zeigt eine relative Zunahme des Peaks der N-H- und der O-H-Valenzschwingung bei $3400 - 3500 \text{ cm}^{-1}$, ersterer entstammt dem Triäthylentetramin, letzterer entstammt der im Polymeren enthaltenen Feuchtigkeit. Stark abgenommen hat die Intensität der Signale der Carboxylgruppe bei ca. 2600 cm^{-1} und bei 1730 cm^{-1} . Dieses ist trotz der unterschiedlichen Intensität der beiden Spektren deutlich sichtbar. Ein neuer Peak für die gebildeten Amidgruppen ist nicht erkennbar, die zugehörige Bande sollte an der gleichen Stelle wie die Amidbande des Pyrrolidonringes liegen.

Die Bestimmung der molaren Masse des Trägers 2b mit Hilfe der Ultrazentrifuge ergab bei der Verwendung des partiellen spezifischen Volumens von Träger 1 eine Masse von 11700 g/mol. Diese Masse ist ähnlich derjenigen von Träger 1, die gewünschten Vernetzungen sind demnach nicht aufgetreten. Auch die ausgiebige Membranfiltration des Trägers 2b nach der Herstellung hat nicht zu einer Anreicherung von Molekülen mit einer höheren Molmasse geführt.

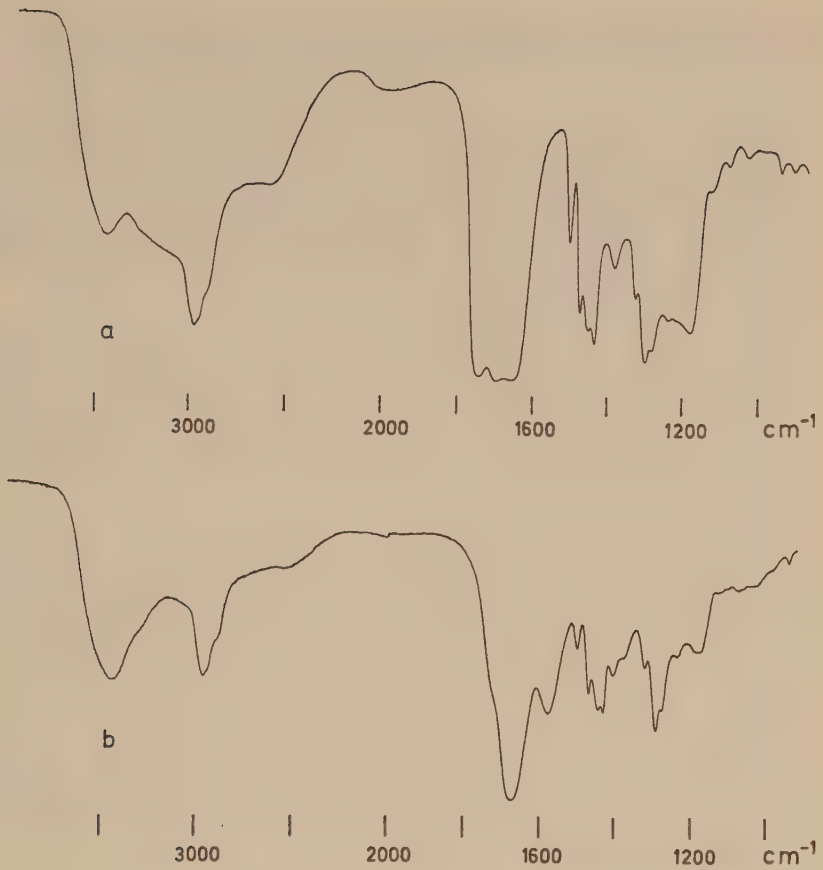


Abb. 2: IR-Spektren der Träger 1 (a) und 2b (b) (KBr-Preßlinge)

Die durch die Ultrazentrifuge gewonnen Ergebnisse sind in Tabelle 12 in Kapitel 2.2.1.4.7 zusammengestellt.

2.1.4. Copolymere aus N-Vinylpyrrolidon und Vinylalkohol (Polymere 3 - 5)

Polyvinylalkohol ist aufgrund seiner zahlreichen Hydroxylgruppen sehr hydrophil und daher gut in Wasser löslich. Die Auflösungsgeschwindigkeit ist allerdings recht gering, da die Moleküle durch Wasserstoffbrücken untereinander vernetzt und verknäult sind. Daher sind höhere Temperaturen zum Auflösen von Polyvinylalkohol notwendig. Eine derartige Beschleunigung oder auch Ermöglichung der Bildung einer Lösung ist aber nicht möglich, wenn Enzyme an dieses Polymeregebunden sind.

Weitere Nachteile des Polyvinylalkohols sind seine leichte Oxidierbarkeit und die Möglichkeit, unter Bildung konjugierter Doppelbindungen leicht Wasser abzuspalten. Dies wird dadurch sichtbar, daß Polyvinylalkohol leicht gelbe, braune oder sogar schwarze Reaktionsprodukte bildet, besonders bei höherer Temperatur (60).

Die Möglichkeit der Bildung konjugierter Doppelbindungen kann durch eine Copolymerisation mit einem anderen Monomeren unterbunden werden, denn die Bildung isolierter Doppelbindungen oder niedrig konjugierter Systeme ist thermodynamisch nicht so begünstigt wie die Bildung hochkonjugierter Systeme.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das NVP als Comonomer verwendet, das neben der Stabilisierung der Vinylalkoholeinheiten im Polymeren auch einen Beitrag zur Löslichkeit des Polymeren liefern sollte. Derartige Polymere wurden z.B. schon von K. Geckeler und E. Bayer (9) beschrieben und als Träger für Peptidsynthesen eingesetzt.

Monomerer Vinylalkohol ist nicht bekannt, er ist formal das Enol-Tautomer des Acetaldehyds. Polymere des Vinylalkohols werden durch Polymerisation von Vinylacetat mit anschließender Hydrolyse dargestellt.

Das Polymerisationsverhalten der beiden Monomeren NVP und Vinylacetat wurde von J.F. Bork und L.E. Coleman untersucht (61). Sie haben die Copolymerisationsparameter von beiden Monomeren bestimmt und daraus auch die Q- und e-Werte von NVP und Vinylacetat berechnet. Während die Parameter r_1 und r_2

der beiden Monomeren nur für jeweils ein bestimmtes Monomerenpaar gelten, sind die Q- und e-Werte nach dem Modell von T. Alfrey und C. Price Maßzahlen für Eigenschaften eines Monomeren.

Es wurde postuliert, daß die Aktivierungsenergie eines Wachstumsschrittes einer wachsenden Polymerkette bei radikalischer Polymerisation überwiegend durch das Ausmaß der Resonanzstabilisierung des wachsenden Radikalkettenendes und durch die effektiven partiellen Ladungen am radikalischen C-Atom bestimmt wird. Dabei ist Q ein Maß für die Resonanzstabilisierung und e ein Maß für die Ladung. Theoretisch sind diese Werte noch nicht bestimmbar, sie sind aber über die aus kinetischen Untersuchungen zugänglichen Copolymerisationsparameter r_1 und r_2 zu berechnen. Da dem Modell vereinfachende Annahmen zugrunde liegen, machen die Q- und e-Werte weniger quantitative als eher qualitative Aussagen (62).

J.F. Bork und L.E. Coleman (61) errechneten für NVP die Werte $Q = 0,093$ und $e = -1,17$ und für Vinylacetat $Q = 0,02$ und $e = -0,4$. Aus den ähnlichen Q-Werten kann man ersehen, daß beide Radikalkettenenden in ähnlichem Maße resonanzstabilisiert sind. Es werden also während des Polymerkettenwachstums keine besonders stabilen Radikale gebildet, die das weitere Wachstum behindern könnten. Die beiden Monomeren eignen sich gut zur Copolymerisation, wenn auch nicht alternierend, wie aus den gleichen Vorzeichen der beiden e-Werte ersichtlich ist.

Die Copolymerisation von NVP und Vinylacetat wurde radikalisch mit Azo-bis-(isobuttersäurenitril) im Bombenrohr durchgeführt.

Tabelle 2

Polymeres	Ansatz			Produkt	
	mMol NVP	mMol Vinylacetat	Mol%	Mol% Vinylalkohol ber. aus Elementar- analyse der ent- sprechenden Acetate	ber. nach Hydro- lyse (s. Text)
3 (4)	20,4	20,0	50	42	38
4 (9)	20,2	60,3	75	74	73
5 (11)	39,9	20,0	33	32	31

Im Gegensatz zu Träger 1, der aus dem Polymerisationslösungsmittel ausfiel und so schon in einer feinverteilten Form vorlag, mußten die Acetate der Polymeren 3 - 5, die in Substanz polymerisiert worden waren, erst gelöst und dann in eine leicht zu handhabende Form überführt werden. Nach der Aufarbeitung lagen die Träger in wäßriger Lösung vor. Bei der Isolierung der Polymeren führte das Abdampfen des Wassers zu nur oberflächlich trocknen, fest am Glas haftenden Produkten. Eine Fällung in einer nicht lösenden Flüssigkeit führte zu Perlen, die Flüssigkeit eingeschlossen hatten. Nur durch die Gefriertrocknung wurden lockere, zerteilbare Massen erhalten, die gut zu verarbeiten waren.

Die Hydrolyse der NVP-Vinylacetat-Copolymeren zu den entsprechenden Vinylalkohol-Copolymeren wurde nach K. Geckeler und E. Bayer (9) mit verdünnter Natronlauge durchgeführt. Die überschüssige Lauge wurde mit Salzsäure titriert. Die Zusammensetzung der Polymeren wurde mit Hilfe des elementaranalytisch bestimmten Stickstoffgehaltes berechnet. Aus der Tatsache, daß sowohl durch die Elementaranalyse als auch durch Rückrechnung der bei der Titration gewonnenen Werte gleiche oder fast gleiche Mengen an Vinylacetat gefunden wurden, kann geschlossen werden, daß die Hydrolyse vollständig, oder wie bei Polymer 3, fast vollständig abgelaufen ist.

Da der 5-Ring im NVP ein Amid ist, ist es denkbar, daß auch Amidbindungen hydrolysiert werden. Die alkalische Hydrolyse von Polymeren, die Lactamringe enthalten, ist von A. Conix und G. Smets (63) untersucht worden. Sie bestimmten den Hydrolysegrad von Polyvinylpyrrolidon und von einem NVP-Maleinsäure-Copolymeren in Gegenwart von 1 N NaOH und bei Temperaturen von 100° C und mehr. Danach war das Copolymer nach 2 Stunden zu 14,7 % hydrolysiert, das Homopolymer nach 3 Stunden zu 10,8 %. Da bei den Acetaten der Polymeren 3-5 unter wesentlich milderer Bedingungen gearbeitet wurde, konnte eine Hydrolyse des Lactamringes allenfalls in sehr geringem Umfang auftreten, was man auch durch einen Vergleich des IR-Spektrums eines NVP-Vinylacetat-Copolymeren mit dem Spektrum des entsprechenden Vinylalkohol-Copolymeren erkennen kann. Die wesentlichen Unterschiede beider Spektren sind die fehlende Ester-carbonylbande bei 1740 cm^{-1} und die fehlende Bande für Acetylgruppen bei 1370 cm^{-1} . Es erscheinen keine für Carboxylat- oder Carboxylgruppen typischen Schwingungen in den Gebieten $1725\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ und $1610\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$.

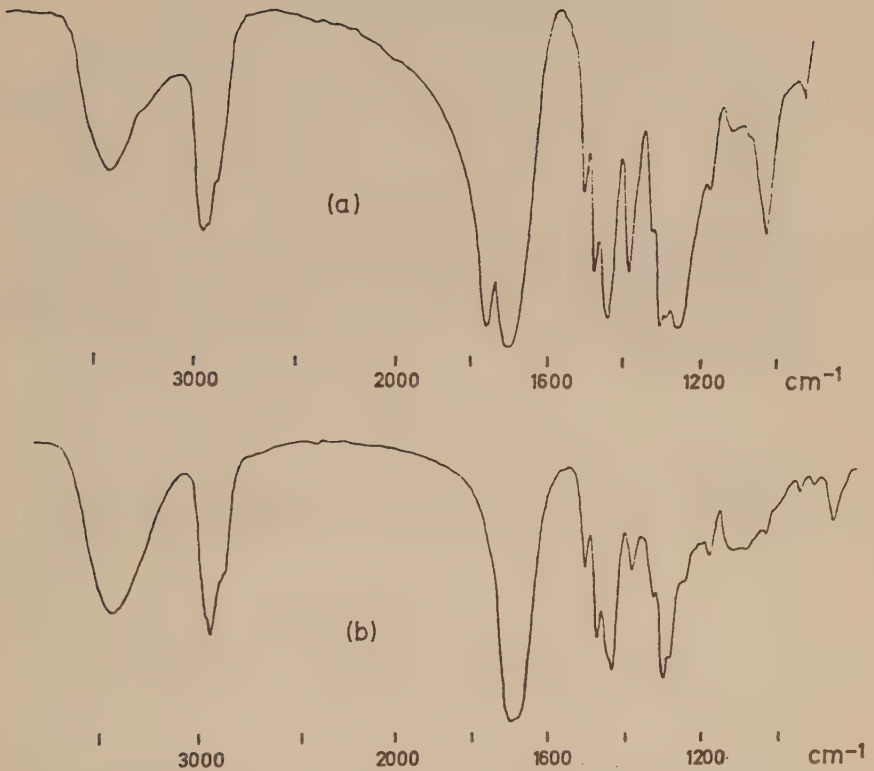


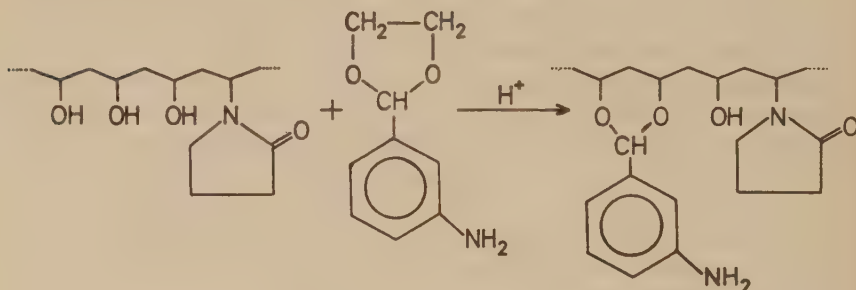
Abb. 3: IR-Spektren von Träger 3-Acetat (a) und Träger 3 (b) (KBr-Preßlinge)

In der Ultrazentrifuge sind die Molmassen von Polymer 4 und dessen Acetat bestimmt worden. Dabei wurden für das Polymer 4 - Acetat 131400 g/mol gefunden und für Polymer 4 120200 g/mol. In beiden Fällen ist das partielle spezifische Volumen von Polymer 4 - Acetat zugrunde gelegt worden. Die leichte Verminderung der molaren Massen ist dadurch erklärbar, daß bei der Polymerisation von Vinylacetat durch Kettenübertragung auch an den Acetatseitenketten Polymerketten entstehen bzw. Estergruppen in die Polymerkette eingebaut werden, die bei der Esterhydrolyse abgespalten werden.

Die mit Hilfe der Ultrazentrifuge erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 12 in Kapitel 2.2.1.4.7 zusammengefaßt.

2.1.4.1. Vinylalkoholhaltige Copolymere mit aromatischen Aminogruppen (Träger 4a - c)

Ausgehend von den NVP-Vinylalkohol-Copolymeren sollten reaktive Träger mit aromatischen Aminogruppen dargestellt werden. Dazu wurden die Polymeren mit 2-(3-Aminophenyl)-1,3-dioxolan umgesetzt. Das Verfahren ist von E. Minami und S. Kojima (64) beschrieben worden. Es ist von H.G. Vogt zur Aktivierung von vernetztem Polyvinylalkohol (65) und in der dieser Arbeit vorangegangenen Diplomarbeit zur Aktivierung von wasserlöslichem Polyvinylalkohol eingesetzt worden (55). Für die Umsetzung wurde das Ausgangspolymer in wäßriger salzsaurer Lösung bei 50° C mit dem Dioxolan zur Reaktion gebracht.



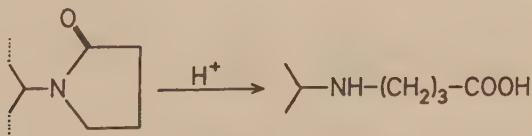
Da jede Dioxolangruppe zur vollständigen Reaktion mit dem Polymeren zwei benachbarte Hydroxylgruppen benötigt, wurde Träger 4 verwendet, der 74 Mol% Vinylalkoholeinheiten enthielt. Der Gehalt der Träger 4a - 4c (Tabelle 3) an m-Aminophenylgruppen wurde photometrisch mit Hilfe einer Eichkurve aus Extinktionswerten des oben erwähnten Dioxolans bestimmt. Der Gehalt des Trägers 4b an m-Aminophenylgruppen ergab bei der Bestimmung einen Wert, der niedriger als erwartet war. Da dieses Polymere nicht mehr vollständig wasserlöslich war, konnte die photometrische Bestimmung nicht einwandfrei erfolgen.

Tabelle 3

Träger	Dioxolan eingesetzt mg/g Träger 4	davon Dioxolan gebunden mg/g Träger 4	mmol Dioxolan pro Gramm Träger 4a/b/c
4a	50,6	39,5	0,23
4b	203,1	36,3	0,22
4c	403,5	63,8	0,37

Eine verminderte Wasserlöslichkeit wurde auch bei den beiden anderen Trägern beobachtet, offenbar hat die Umsetzung mit dem Dioxolan zu Vernetzungen geführt. Höhere Gehalte an m-Aminophenylgruppen sind nur mit einem großen Überschuß an Dioxolan zu erhalten. Hier macht sich wahrscheinlich eine beträchtliche sterische Hinderung des Zugangs zu den Hydroxylgruppen des Polymeren durch die Pyrrolidonringe bemerkbar.

Die Umsetzung im sauren Medium, eine Umacetalisierung, brachte die Gefahr einer Hydrolyse von Lactamringen des NVP mit sich. Eine Titration eventuell entstandener Carboxylgruppen war nicht möglich, da für diese ein ähnlicher



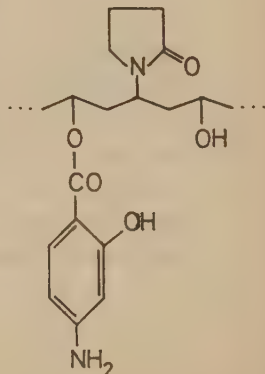
pK_s -Wert zu erwarten war wie für die Aniliniumgruppe des Polymeren. Daher wurde von Träger 4a ein Pyrolysemassenspektrum vor und nach einer Umsetzung mit Dicyclohexylcarbodiimid und p-Nitrophenol angefertigt. Das Pyrolyse-MS von Träger 4a vor der Umsetzung ergab keine Hinweise auf mögliche hydrolytische Spaltungen des Lactamringes. Größere Fragmente aus der bei einer Hydrolyse entstehenden Gruppe $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_3\text{-COOH}$ waren nicht erkennbar. Unter Umständen vorhandene kleinere Fragmente wären im Untergrund der zahlreichen Pyrolysespaltprodukte verloren gegangen. Die wenigen Peaks, die mit einiger Sicherheit zuzuordnen waren, entstammten der acetalisch gebundenen aromatischen Gruppe (m/e 91 und m/e 105). Daneben erschienen bei höheren Temperaturen Bruchstücke des NVP (m/e 85, Ring des Pyrrolidon-2)

und Dimere des NVP (m/e 223) (zu den Fragmenten der Pyrolysemassenspektren s. Tabelle 6, Kapitel 2.1.6.). Dies ist ein Hinweis darauf, daß trotz des NVP-Gehaltes von nur 25 Mol% im Träger 4a NVP-Gruppen benachbart in das Polymer eingebaut worden sind.

Um nach Möglichkeit eindeutige Aussagen erhalten zu können, wurde Träger 4a mit p-Nitrophenol umgesetzt in Erwartung, daß die bei der möglichen Hydrolyse des NVP entstandenen Carboxylgruppen mit dem Phenol Ester bilden. Die p-Nitrophenylester von Carbonsäuren bilden sich leicht und die Esterbindung sollte unter Pyrolysebedingungen gut gespalten werden, so daß im Massenspektrum schon bei niedrigen Pyrolysetemperaturen ein Peak bei m/e 138 für das p-Nitrophenolation zu erwarten gewesen wäre. Ein Signal bei m/e 138 war nicht zu beobachten, ebenso keine weiteren möglichen Fragmente des p-Nitrophenols. Die Pyrolyse erbrachte nur Bruchstücke des eingesetzten Polymeren, ähnlich wie vor der Umsetzung. Dem Pyrolysemassenspektrum kann demnach entnommen werden, daß eine Hydrolyse des Lactamringes des NVP nicht in nennenswertem Umfange aufgetreten ist.

2.1.4.2. Vinylalkoholhaltige Copolymere, verestert mit p-Aminosalicylsäure (Träger 5a - c)

Im Verlaufe der Anwendung der Träger 4a - 4c stellte es sich heraus, daß diese in Wasser schlecht löslich waren. Die entsprechenden enzymhaltigen Konjugate waren nach der Gefriertrocknung alle zumindest teilweise unlöslich. Eine Ursache für die schlechte Löslichkeit kann darin liegen, daß während der polymeranalogen Modifizierung des Trägers 4 Vernetzungsreaktionen aufgetreten sind, weil das dort eingesetzte 1,3-Dioxolan möglicherweise mit zwei Hydroxylgruppen von verschiedenen Polymerketten reagiert hat. Um solche Vernetzungen zu vermeiden, wurde ein NVP/Vinylalkohol-Copolymer mit einem einwertigen Liganden umgesetzt, dem Methylester der p-Aminosalicylsäure. Die p-Aminosalicylsäure wurde als Ligand der p-Aminobenzoesäure vorgezogen, um durch die zusätzliche Hydroxylgruppe die Hydrophobie des aromatischen Ringes zumindest teilweise zu kompensieren.



Mit p-Aminosalicylsäure (PAS) derivatisierter PVA ist von I.S. Varga und Z. Wolkober (66) beschrieben worden. Er wurde durch eine Umesterung des Methylesters der Säure dargestellt. Die Produkte enthielten bis zu 40 Gew.% PAS.

Das verwendete Polymere 5 enthielt nur 26 Mol% Vinylalkoholgruppen, also wesentlich weniger als das Polymere 4. Die Wahrscheinlichkeit, daß in Polymer 5 zwei Vinylalkoholgruppen benachbart sind, ist recht gering. Die zwischen zwei NVP-Einheiten eingeschlossenen Vinylalkoholeinheiten waren für die Reaktion mit dem PAS-Methylester sicherlich sterisch behindert. Trotz eines großen Überschusses an Ester bei der Umesterung enthielten die Träger 5a - c nur wenige PAS-Gruppen.

Tabelle 4

Träger	Ansatz		Gew.% PAS-Ester		Bindungs- ausbeute	reaktive Gruppen im Träger
	Träger 5	PAS-Ester	im Ansatz	im Produkt		
5a	0,50 g	0,11 g	18,0	0,45	2,5 %	27 µMol/g
5b	0,50 g	0,22 g	30,6	1,03	3,4 %	62 µMol/g
5c	0,50 g	0,44 g	46,8	1,47	3,1 %	88 µMol/g

Der Gehalt an PAS-Gruppen wurde photometrisch über die zweite Ableitung des Spektrums bestimmt. Als Vergleich diente eine Lösung von PAS-Methylester. Die Derivativspektroskopie und ihre Anwendung werden in Kapitel 2.2.1.4.1 eingehend erläutert.

Eine Kontrolle der Ergebnisse mit Hilfe der Elementaranalyse war wegen des geringen PAS-Gehaltes nicht möglich.

2.1.5. Copolymere aus N-Vinylpyrrolidon und Acrylsäureäthylester
(Polymere 6a - c) und deren Umsetzung zu den Säurehydraziden
(Träger 6a - c)

Als reaktive Polymere sollten auch Säurehydrazide untersucht werden. Homopolymere des in dieser Arbeit in Copolymeren eingesetzten Acrylsäurehydrazids sind z.B. von W. Kern et al. (67) untersucht worden. Monomeres Acrylsäurehydrazid ist nach den üblichen Verfahren durch Hydrazinolyse von Acrylsäureestern nicht erhältlich, die Produkte zyklisieren unter Bildung von Pyrazolidon. Poly-acrylsäurehydrazid ist aber leicht durch die Umsetzung von Poly-acrylsäureestern erhältlich. Bei dieser Umsetzung ist zu beachten, daß durch das bifunktionelle Hydrazin sehr leicht Vernetzungen und damit unlösliche Produkte auftreten können.

Für die vorliegende Arbeit wurden Copolymere des NVP und des Acrylsäureäthylesters dargestellt. Die beiden Monomeren eignen sich aufgrund ihrer ähnlichen aber gegensinnigen Ladung am radikalischen C-Atom (e-Wert) und einer mäßigen Differenz der Q-Werte gut für eine Copolymerisation.

Nachdem die radikalische Polymerisation in Substanz nur schwer zu handhabende Produkte geliefert hatte, wurde die Polymerisation radikalisch in n-Butanol als Lösungsmittel und mit einem höheren Initiatoranteil zur Verminderung der Molmassen der Polymeren durchgeführt. Zur Reinigung nach der Reaktion wurden wäßrige Lösungen der Produkte dialysiert.

Die Polymeren zeigten eine Anreicherung des Äthylacrylates verglichen mit der Zusammensetzung des Ansatzes. Eine Berechnung des Gehaltes an den Monomeren aus den elementaranalytisch bestimmten Werten für den C- und den N-Gehalt war nur möglich, wenn ein Wassergehalt von ca. 6,5 Gew.% im Polymeren angenommen wurde.

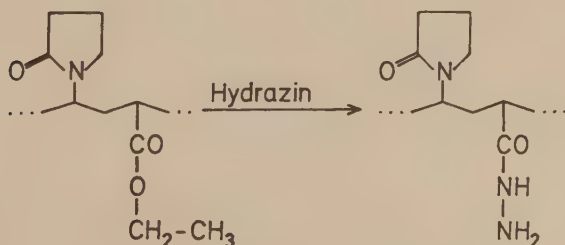
Tabelle 5

Zusammensetzung der Polymeren 6a, 6b und 6c

Polymeres		6a	6b	6c
Ansatz: Mol% NVP		89,4	94,6	97,1
Mol% Äthylacrylat		10,2	5,0	2,5
Mol% AIBN		0,4	0,4	0,4
gef. lt. Elementaranalyse	%C	59,66	60,14	60,42
	%N	9,95	10,73	11,30
berechnet für untenstehende	%C	59,84	60,21	60,39
Anteile der Monomeren in				
den Polymeren (s.u.)	%N	9,95	10,81	11,24
berechnete Zusammensetzung				
(bezogen auf wasserfreie				
Substanz) Mol% NVP		83	91	95
Mol% Äthylacrylat		17	9	5

(Bei der Berechnung des C- und des N-Gehaltes wurden 6,5 Gew.% Wasser einbezogen.)

Die weitere Umsetzung der Estergruppen zum Säurehydrazid erfolgte mit einem großen Überschuß an Hydrazin, um Vernetzungsreaktionen zu unterdrücken. Die Polymeren waren nach der Hydrazinolyse ganz bzw. fast ganz in Wasser löslich. Nach einer Dialyse und Gefriertrocknung wurden sie zur Bindung von Trypsin eingesetzt (Kapitel 2.2.4).



Wie die Ausschnitte aus den IR-Spektren des Polymeren 6a und dessen Hydrazid zeigen, ist die Hydrazinolyse vermutlich vollständig abgelaufen. Der kleine Peak der Äthylestergruppe bei 1730 cm^{-1} in Abb. 4a ist nach der Umsetzung

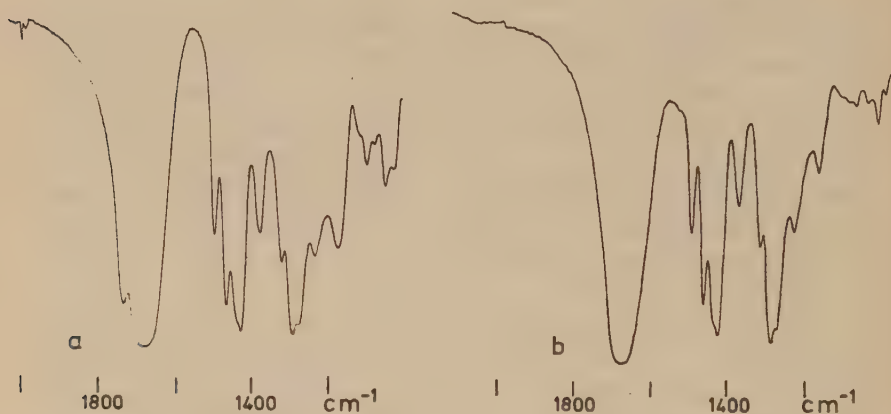


Abb. 4: Ausschnitt aus den IR-Spektren von Träger 6a(a) und dessen Hydrazid (b)

ganz verschwunden. Ebenfalls auf die Äthylestergruppe ist der nach der Umsetzung wesentlich kleinere Peak bei 1170 cm^{-1} zurückzuführen. Ob der an dieser Stelle verbliebene kleine Peak auf doch noch vorhandenen Estergruppen beruht, kann nicht beurteilt werden.

Die Hydrazide können auch nach ihrer Umsetzung zu einem Säureazid zur Bindung von Enzymen eingesetzt werden. Dieses wurde ebenfalls versucht. Die Umsetzungen verliefen glatt und das Azid ließ sich im IR-Spektrum anhand seiner charakteristischen Bande bei 2140 cm^{-1} leicht identifizieren. Die Azidgruppe ist recht stabil. Das Polymere konnte getrocknet werden und zeigte auch nach mehreren Tagen den erwähnten Peak im IR-Spektrum.

Da die beschriebenen polymeren Hydrazide nur noch sehr langsam im Wasser löslich waren, weil trotz des über 100-fachen Hydrazinüberschusses bezogen auf die Acrylsäureestergruppen Vernetzungen stattgefunden hatten, ist versucht worden, durch Änderungen der Bedingungen der Hydrazinolyse zu besser

löslichen Produkten zu gelangen. Es erbrachten aber weder die Verwendung des Acrylsäuremethylesters anstatt des Äthylesters noch Versuche zur Hydrazinolyse in Gegenwart von Lösungsmitteln Polymere mit einer ausreichenden Löslichkeit. Daher wurde auf den weiteren Einsatz von polymeren Hydraziden und daraus abgeleiteten Polymeren verzichtet.

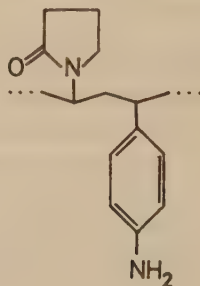
2.1.6. Copolymer aus N-Vinylpyrrolidon und p-Aminostyrol (Träger 7)

NVP und Styrol sind zwei Monomere, die schlecht miteinander copolymerisierbar sind. J.F. Bork und L.E. Coleman (61) geben für die radikalische Polymerisation dieser beiden Monomeren die Werte $r(\text{NVP})$ 0,045 und $r(\text{Styrol})$ 15,7 an, d.h. eine Styroleinheit am Ende der wachsenden Polymerkette wird viel eher mit einer weiteren Styroleinheit reagieren als mit einem NVP-Molekül. Als Q - und e -Werte der Monomeren findet man 1,0 und -0,8 für Styrol (Festlegung als Berechnungsgrundlage) und 0,09 und -1,17 für NVP (61). Die entsprechenden Werte für das p-Aminostyrol selbst sind bisher nur einmal bestimmt worden. Sie sind für eine Copolymerisation mit NVP noch ungünstiger als die Werte für Styrol. Es wurden die Werte $Q = + 2,324$ und $e = - 1,614$ gefunden (68).

Aus den Q -Werten, dem Maß für die Resonanzstabilisierung des entsprechenden Endgliedes der wachsenden Polymerkette, ersieht man, daß eine Styrol- bzw. p-Aminostyroleinheit am Kettenende deutlich stabiler als eine NVP-Einheit ist. Entsprechend den ungünstigen Copolymerisationsparametern wurden bei der radikalischen Copolymerisation der beiden Monomeren in sehr geringer Ausbeute Produkte erhalten, bei denen es sich nach den ersten Untersuchungen überwiegend um Poly-(p-aminostyrol) handelte. Zur Überwindung der Schwierigkeiten bei der Copolymerisation gibt es mehrere Möglichkeiten. Eine ist von J.D. Semtschikow (69) vorgeschlagen worden. Danach ist es möglich, durch Einwirkung von Carbonsäuren eine Polarisierung der Carbonylgruppe im NVP herbeizuführen. Das wiederum soll zu einer besseren Stabilisierung des NVP-Radikals am Kettenende führen, wie sich aus den veränderten Q - und e -Werten sowie aus den Copolymerisationsparametern r_1 und r_2 ergibt. Die Q - und e -Werte ändern sich so, daß eine alternierende Copolymerisation zu erwarten ist. Dies konnte J.D. Semtschikow auch beobachten. Untersucht

worden ist die Wirkung von Säuren mit pK_s -Werten von ca. 20 bis 1. Als wirkungsvoll erwiesen sich Chloressigsäure und Essigsäure. Ein Versuch mit Chloressigsäure schlug allerdings fehl. Zum einen sind Wechselwirkungen zwischen der Aminogruppe des p-Aminostyrols und der Säure denkbar, zum anderen sind halogenierte Substanzen in hohem Maße zu Übertragungsreaktionen befähigt, so daß die Polymerisation vermutlich nur zu Oligomeren führte.

Eine andere Möglichkeit zur Copolymerisation von Monomeren mit dafür ungeeigneten Eigenschaften besteht darin, daß die schlechter polymerisierende Komponente vorgelegt wird und man das andere Monomer in dem Maße, in dem es abreagiert, zutropft (70). Nach diesem Verfahren wurde ein p-Aminostyrol/NVP-Copolymer erhalten. Das Polymerisationsprodukt wurde aus Äthanol mit Petroläther gefällt und mit Petroläther gewaschen und nach dem Trocknen in Wasser gelöst. Die trübe Lösung wurde gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert. Das Produkt ist nach der Gefriertrocknung eine lockere, leicht gelb gefärbte Substanz, die in Wasser nur eine trübe Aufschwämmung ergibt, sich aber auf Zugabe von wenig Säure schnell löst.



p-Aminostyrol/NVP-Copolymere sind erst vor relativ kurzer Zeit erstmals beschrieben worden und zwar als Träger für metallhaltige Komplexe (71,72).

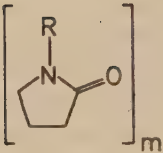
Das monomere p-Aminostyrol wurde durch Nitrierung von (2-Bromäthyl)benzol zum p-Nitro-(2-bromäthyl)-benzol, HBr-Eliminierung mit alkoholischer Kalilauge zum p-Nitrostyrol und anschließender Reduktion mit Aluminiumamalgam erhalten. Die Reinigung erfolgte durch eine Wasserdampfdestillation und Umkristallisation aus Petroläther. p-Aminostyrol bildet farblose Blättchen, die sich an der Luft gelb färben und bei ca. 20°C schmelzen.

Der Gehalt des Copolymeren an Aminostyrol wurde photometrisch bestimmt mit p-Toluidin als Vergleich, wie es auch von H. Morawetz (73) beschrieben worden ist. Dazu wurden die optischen Dichten der Lösungen beider Substanzen in 75 %igem wäßrigen Äthanol verglichen. Die Abweichung der Absorptionsmaxima beider Substanzen von 3 nm wurde vernachlässigt. Es wurden 11,7 Gew.% p-Aminostyrol entsprechend 11 Mol% gefunden. Der Anteil von 11,1 Gew.% im Polymerisationsansatz ist also vollständig einpolymerisiert worden.

Für die kovalente Bindung von Enzymen an das NVP/p-Aminostyrol-Copolymere wäre es von Vorteil, wenn die reaktiven Gruppen des Polymeren gleichmäßig entlang der Polymerkette verteilt wären. Dieses würde ermöglichen, eine höhere Enzymmenge als in dem Fall zu binden, in dem das reaktive Monomere in Blöcken einpolymerisiert wäre. Zur Klärung der Frage, ob Blöcke von p-Aminostyrol im Copolymeren auftreten, wurde von diesem ein Pyrolyse-massenspektrum angefertigt. Zur Identifizierung derjenigen Fragmente, die aus p-Aminostyrolblöcken entstanden sein könnten, wurde zum Vergleich ein Pyrolysemassenspektrum des entsprechenden Homopolymeren angefertigt. Bei dieser Methode der Massenspektrometrie wurden das Copolymere und das Homopolymere des p-Aminostyrols in der Ionenquelle eines Hochauflösungsmassenspektrometers im Temperaturbereich von 40 - 450°C fraktioniert verdampft. Die auftretenden Monomereinheiten bzw. die durch die pyrolytische Spaltung der Polymeren gebildeten Fragmentationen geben Auskunft über die Sequenzen im Copolymeren, über die Stabilitäten der Polymeren und über terminale Funktionen. In Tabelle 6 und Tabelle 7 sind eine Reihe von aussagekräftigen Fragmenten der Polymeren aufgeführt. Die Intensitäten der Peaks wurden auf die Intensität des Peaks des monomeren p-Aminostyrols bezogen. Dabei sind für das Copolymer die beiden höchsten Pyrolysetemperaturen von

380°C und 450°C berücksichtigt. Bei der Pyrolysetemperatur von 300°C wurden wesentlich weniger Fragmente beobachtet. Das Homopolymer erbrachte bei Temperaturen oberhalb von 300°C nur wenige neue Fragmente, so daß für die Angabe der relativen Intensitäten die bei dieser Temperatur erhaltenen Peaks ausgewertet wurden. Die wichtigsten neu auftauchenden Fragmente sind das Tetramer und das Pentamer des p-Aminostyrols. Die Tatsache, daß das Copolymer erst bei höheren Temperaturen, verglichen mit dem Poly(p-aminostyrol), stark fragmentiert, weist auf eine höhere thermische Stabilität des Copolymeren hin.

Tabelle 6
Fragmente des Pyrolysemassenspektrums von Träger 7
relative Peakintensitäten

		m/e	% von m/e 119		- R
			380°C	450°C	
	n = 1	91	16	39	minus-H
		106	39	84	-CH ₂ (a)
		119	100	100	-C ₂ H ₃ (Monomer)
		130	18	12	-C ₃ H ₂ (b)
		144	14	18	-C ₄ H ₄ (c)
		171	27	15	-C ₆ H ₇
	n = 2	235	3	11	-C ₄ H ₃
		248	2	7	-C ₅ H ₄
	n = 3	357	1	2	-C ₆ H ₉
					- H
	m = 1	85	27	93	- C ₂ H ₃ (Monomer)
		111	41	94	- C ₃ H ₄
		124	23	47	- C ₃ H ₅
	m = 2	209	3	16	- C ₄ H ₇
		223	14	10	- C ₅ H ₉
	m = 3	321	1	3	- C ₆ H ₉
		333	3	10	- C ₈ H ₁₂
	m = 4	444	1	2	- C ₆ H ₉
	n = 1, m = 2	341	13	6	- C ₆ H ₉
	n = 2, m = 1	349	20	7	- C ₆ H ₉
	n = 1, m = 1	256	1	4	- C ₆ H ₈

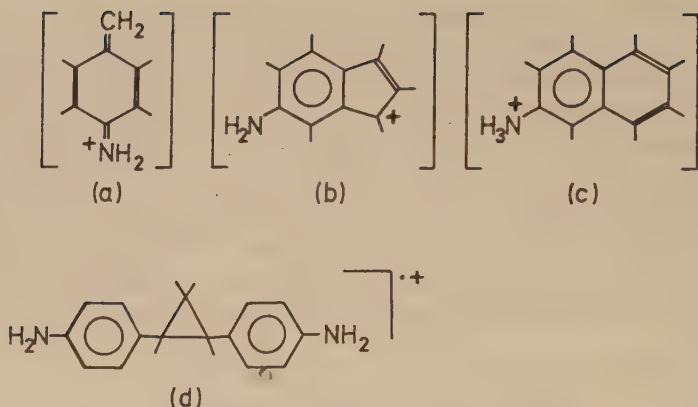
Bei dem Vergleich der beiden Tabellen fällt auf, daß von den Peaks des Homopolymeren, die von Fragmenten mit mehr als einer Styroleinheit verursacht werden, bis auf eine Ausnahme keiner im Massenspektrum des Copolymeren erscheint. Die Ursache dafür ist, daß die Polymeren komplexe Gemische darstellen, die im Pyrolysemassenspektrum Peaks mit stark schwankenden Intensitäten liefern. Wenn auch die höheren Ionen nur schwer interpretierbar sind, so lassen sich dennoch einige Peaks des Copolymeren mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit deuten, wenn man sie Dimeren und Trimeren der Styroleinheit oder Fragmenten, die beide Monomeren enthalten, zuordnet. Es sind demnach vermutlich relativ häufig mindestens zwei Styroleinheiten

Tabelle 7

Fragmente des Pyrolysemassenspektrums von Poly-(p-aminostyrol)

n	m/e	relative Peakintensität		R
		% von m/e 119 (300°C)		
	1	91	21	minus -H
		106	29	CH ₂ (a)
		119	100	C ₂ H ₃ (M) ⁺
		130	42	C ₃ H ₂ (b)
		144	13	C ₄ H ₄ (c)
		164	8	C ₅ H ₁₁
	2	180	4	C ₄ H ₃ -(HCN+C ₂ H ₄)
		208	6	C ₄ H ₃ -(HCN)
		224	81	C ₃ H ₄ (d)
		239	60	C ₄ H ₇ (2M+H) ⁺
3	343	19	C ₅ H ₇	
	357	29	C ₆ H ₁₀	(3M+H) ⁺
4	461	(380 ⁰)	C ₇ H ₉	
	476	(380 ⁰)	C ₈ H ₁₂	(4M) ⁺
5	595	(380 ⁰)	C ₁₀ H ₁₅	(5M) ⁺

M = Monomeres



in der Polymerkette benachbart trotz eines Gehaltes von nur 11 Mol%. Von dem zweiten Monomeren, dem NVP, sind im Pyrolysemassenspektrum des Copolymeren deutlich noch das Trimere und das Tetramere erkennbar. Größere Einheiten, die ebenfalls vorkommen sollten, fragmentieren unter den Bedingungen der Pyrolyse.

2.2. Enzyme, kovalent gebunden an wasserlösliche reaktive Polymere

An wasserlösliche Polymere wurden die Enzyme Trypsin, Peroxidase und Aminoacylase kovalent gebunden. Trypsin wurde mit den Trägern 1, 2a, 2b und 6a - c, Peroxidase mit den Trägern 1, 4a, 5a - c und 7 umgesetzt. Aminoacylase wurde an die Träger 1, 4a und 7 gebunden.

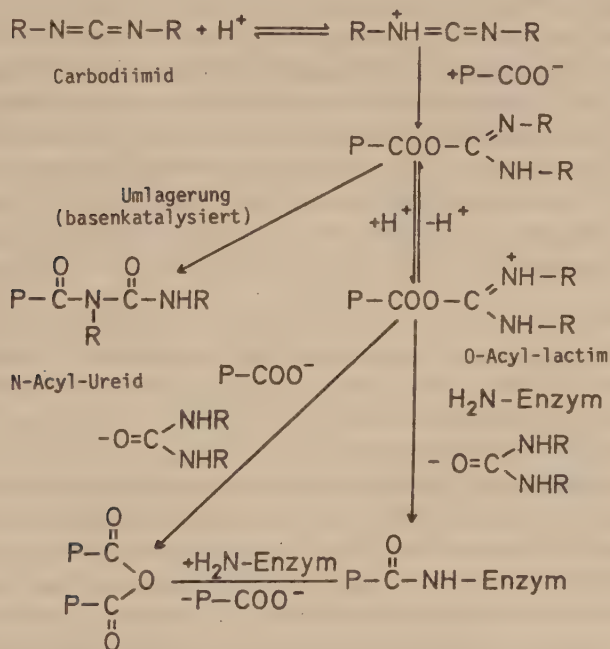
2.2.1 Konjugate aus Träger 1 und Trypsin (PT 1 - PT 29)

2.2.1.1 Kupplung von Trypsin an Träger 1

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Eigenschaften der (Träger 1/Trypsin)-Konjugate von verschiedenen Kupplungsbedingungen wurden etliche dieser Konjugate dargestellt. Als Aktivierungsreagenz für die Carboxylgruppen von Träger 1 wurde das wasserlösliche 1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (CDI) eingesetzt. Carbodiimide sind die am häufigsten verwendeten

Kupplungsreagentien für die kovalente Bindung von Enzymen an carboxylgruppenhaltige Polymere.

Carbodiimide sind von J.C. Sheehan et al. (74) für die Bildung von Amidbindungen eingeführt worden. Folgender Reaktionsmechanismus gilt als gesichert (75):



P: Polymerkette

Als Nebenprodukte können N-Acyl-Ureide und Anhydride entstehen. Die Ureidbildung ist basenkatalysiert, das Produkt ermöglicht keine Bindung von Enzym. Die Anhydridbildung ist beim eingesetzten Polymeren aus sterischen Gründen unwahrscheinlich, sie würde aber nicht stören, da das Anhydrid ebenso wie das O-Acyl-lactim leicht aminolytisch zersetzt werden kann und so die gewünschte Enzyymbildung ermöglicht. Das verwendete CDI wurde nach

J.C. Sheehan (76) aus Äthylisocyanat und N,N-Dimethyl-1,3-propandiamin hergestellt.

Die Reaktionsbedingungen für die Verwendung von CDI sind von H.Ozawa für die Reaktion von Insulin mit einem niedermolekularen Amin eingehend untersucht worden (77). Danach sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit des CDI mit Carboxylgruppen mit steigendem pH-Wert, gleichzeitig erhöht sich die Stabilität des CDI. Neben den Eigenschaften des CDI haben auch die isoelektrischen Punkte der Enzyme und die pK_s -Werte der beteiligten Carboxylgruppen Einfluß auf die für eine Kupplungsreaktion günstigsten Bedingungen. T.P. Mate et al. führten die Reaktion mit CDI bei pH 7 durch, nahe dem pK_s ihres methacrylsäurehaltigen Polymeren (73). S. Emi et al. fanden, daß pH 3 für die Reaktion eines Äthylen-Maleinsäure-Copolymeren mit CDI und einer sauren Protease am günstigsten war. Dieser pH-Wert liegt in der Nähe des isoelektrischen Punktes der eingesetzten Protease und nahe dem pK_s des Polymeren (43).

In den Ansätzen zur Darstellung der (Träger 1/Trypsin)-Konjugate wurden folgende Variationen der Reaktionsbedingungen vorgenommen:

- Variation der Mengen des CDI und des Enzyms bei konstanter Polymereinwaage,
- Variation der Reaktionszeit und
- Variation des Reaktions-pH-Wertes.

Für die Umsetzung wurde Träger 1 in Bikarbonatlösung gelöst und mit dem CDI versetzt. Die stark alkalische Lösung wurde anschließend mit HCl auf ca. pH 7 eingestellt, um die Ureidbildung zu unterdrücken. Nach einer halben Stunde Reaktionszeit wurde das in Phosphatpuffer gelöste Enzym zugegeben und der gewünschte pH-Wert wurde eingestellt. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Kupplungsreaktion meist der schwach saure pH 6 gewählt. Er liegt nahe dem pK_s 5,7 von Träger 1, es sind also ausreichend Carboxylatgruppen für die Reaktion mit dem CDI vorhanden. Außerdem ist das Polymere bei tieferen pH-Werten schlechter löslich. Die Reaktionszeiten betrugen 2 Stunden, 20 Stunden und ca. 2 Tage (Tabelle 5). Bei der Reaktionszeit von zwei Stunden wurde bei Raumtemperatur umgesetzt. Bei den längeren Reaktionszeiten wurde nach der Zugabe des Enzyms eine halbe Stunde bei Raumtemperatur gerührt und dann ohne zu rühren bei 4°C umgesetzt.

2.2.1.2 Isolierung und Reinigung der Konjugate

Zur Isolierung und Reinigung der Konjugate aus Träger 1 und Trypsin wurde das Umsetzungsprodukt mit Ammoniumsulfat gefällt und der Niederschlag nach dem Wiederauflösen in Wasser einer Ultrafiltration unterworfen. Eine Alternative zu diesem Verfahren wäre die Gelchromatographie gewesen. Diese hätte zwar eine bessere Fraktionierung und damit Reinigung der Produkte erbracht, hätte aber auch eine zusätzliche Entsalzung erfordert. Die Elution von Gelsäulen nur mit Wasser hatte ungenügende Ergebnisse geliefert. Nach Erfahrungen während der Diplomarbeit sind die zu trennenden Substanzen teilweise am Gel adsorbiert oder in der Elution stark verzögert worden. Da Trypsin seine enzymatische Aktivität nicht nur durch Einwirkung auf seine Tertiärstruktur oder durch chemische Modifikation, sondern auch durch Autolyse verlieren kann, schien ein schnelleres Trennverfahren: Fällung des Umsetzungsproduktes und nachfolgende Ultrafiltration, hier angebracht zu sein.

Zur Präzipitation der Konjugate wurde sowohl festes Ammoniumsulfat als auch eine konzentrierte Lösung desselben verwendet. Unterschiede bei den Produkten wurden nicht festgestellt. Das feste Salz wurde in kleinen Portionen zum Ansatz gegeben, so daß sich vorzeitig entstehende Trübungen durch hohe örtliche Sulfatkonzentrationen wieder auflösen konnten. Die Endkonzentration an Ammoniumsulfat war 2-3 molar. Die Zugabe des Sulfates wurde beendet, als kein weiterer Niederschlag sich bildete. Das Ende der Fällung war gut zu erkennen, da innerhalb eines kleinen Konzentrationsintervalls die Substanz als klebriger, an der Gefäßwandung haftender Niederschlag anfiel. Weiteres Sulfat ergab keine zusätzliche Fällung. Bei den angewendeten Konzentrationen wurde Trypsin aus Lösungen vergleichbarer Konzentration nicht ausgefällt. Dennoch war bei etlichen Ansätzen zu beobachten, daß die Konjugate freies Enzym enthielten, welches in Gegenwart der Immobilisate mitgefällt worden ist.

Zur Ultrafiltration wurden asymmetrische Membranen eingesetzt. Diese bestehen aus einer relativ dicken Stützmembran, der eine nur ca. 0,5 μm dicke Schicht, die eigentliche Trennmembran, aufliegt. Durch diesen Aufbau soll verhindert werden, daß die Membranporen durch Partikel der zu

filtrierenden Substanz verstopft werden. Die Ausschlußgrenzen der in ge-rührten Filtrationszellen hier verwendeten Membranen waren 50000 D bzw. 100000 D. Die verschiedenen Membrantypen führten nicht zu Unterschieden bei den Produkten. Bei beiden Membranen konnte in etlichen Fällen nicht umgesetztes Trypsin gefunden werden. Daraus ist ein wesentlicher Nachteil der Ultrafiltrationsmembranen erkennbar. Die vom Hersteller angegebenen Ausschlußgrenzen gelten nur für ungebrauchte Membranen. Jede Benutzung, insbesondere bei Anwesenheit von makromolekularen Substanzen, führt zu Veränderungen an den Membranporen. Der Betrieb einer Filtrationszelle führt zu steigenden Konzentrationen des Gelösten zur Membran hin. Diese sogenannte Konzentrationspolarisation in der Grenzschicht der Lösung zur Membran kann zwar z.B. durch Rühren verringert werden, ist aber nicht ganz zu beseitigen, besonders wenn die zu filtrierende Lösung im Verlaufe der Filtration schon konzentriert worden ist. Es kann sich eine mehr oder weniger dicke Schicht aus makromolekularer Substanz auf der Membran bilden. Diese Schicht wirkt dann wie eine zusätzliche Membran und senkt die Ausschlußgrenzen. Das Ergebnis einer Membranfiltration kann auch dadurch nachteilig beeinflußt werden, daß Moleküle mit Massen, die nicht sehr viel kleiner sind, als die Ausschlußgrenzen angeben, noch teilweise zurückgehalten werden (s. Abb. 5). Auch wenn die Filtration mit einer Wassermenge bis zum 50-fachen Volumen des Ansatzes durchgeführt wurde, ergaben sich keine besseren Resultate. Allenfalls die Benutzung jeweils neuer Membranen für jede Filtration hätte eine bessere Reinigung der Konjugate erlaubt, aufgrund der hohen Preise für Ultrafiltrationsmembranen wurde von dieser Möglichkeit Abstand genommen. Wegen der schlechten Trennwirkung der Membranen bei Makromolekülen dienten die Membranen im wesentlichen der Entsalzung der Konjugate. Inwieweit dennoch auch nicht umgesetztes Trypsin durch die Membranfiltration abgetrennt worden ist, wurde nicht untersucht.

Bei denjenigen Konjugaten, die nach der Filtration kein ungebundenes Trypsin enthielten (Feststellung durch Elektrofokussierung, s. Kapitel 2.2.1.4.1.) ist entweder die gesamte angebotene Enzymmenge umgesetzt worden oder das freie Enzym ist überwiegend oder ganz durch die Fällung mit Ammoniumsulfat abgetrennt worden.

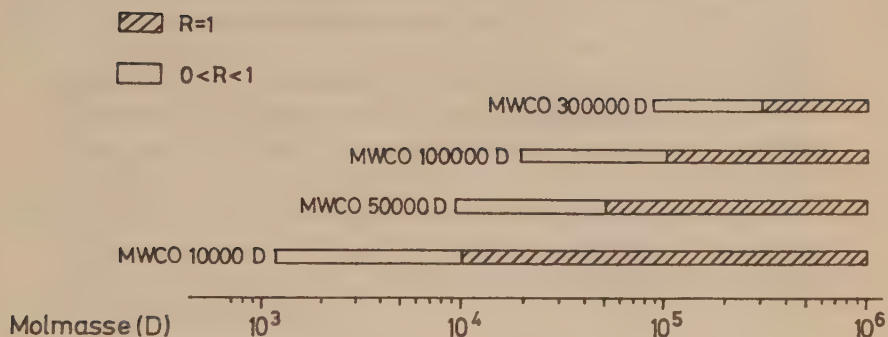


Abb. 5: Trenngrenzen und Rückhaltevermögen der verwendeten Filtrationsmembranen; $R=1$: vollständiges Rückhaltevermögen; $0 < R < 1$: teilweises Rückhaltevermögen; MWCO : molecular weight cut off/ Ausschlußgrenze (aus einem Prospekt der Firma Berghof GmbH).

Die in Tabelle 8 angeführten Konjugate von Träger 1 und Trypsin wurden dargestellt. Sie sollten zeigen, wie das Mischungsverhältnis der einzelnen Komponenten, der pH-Wert und die Reaktionszeit sich auf den Eiweißgehalt und die Aktivität der Produkte auswirken.

Tabelle 8

Konjugate aus Träger 1 und Trypsin. Abhängigkeit der Zusammensetzung von den Reaktionsbedingungen

Konjugat	Mengenverhältnis der Komponenten Träger/CDI/Trypsin			Reaktions- pH	zeit (h)	Eiweißgehalt* (Gew.%)
PT 1	10	2	4	6	2	33,7
PT 2	10	4	4	6	2	37,5
PT 3	10	8	4	6	2	32,8
PT 4	10	16	4	6	2	31,8
PT 5	10	1	1	6	47	8,9
PT 6	10	2	2	6	47	14,6
PT 7	10	4	1	6	46	10,7
PT 8	10	4	2	6	46	12,9
PT 9	10	4	4	6	47	34,8
PT 10	10	4	1	6	49	8,6
PT 11	10	4	2	6	49	16,9
PT 12	10	4	4	6	48	30,5
PT 13	10	4	4	5,1	2	33,7
PT 14	10	4	4	5,5	2	36,5
PT 15	10	4	4	7	2	36,7
PT 16	10	4	2	3	20	17,5
PT 17	10	4	2	6	20	20,3
PT 18	10	4	4	4	20	39,2
PT 19	10	4	4,5	6	42	40,6
PT 20	11	4	4	6,5	2	34,0
PT 21	10	2	8	6	2	49,2
PT 22	10	4	8	6	2	52,2
PT 23	10	3	6	6	2	43,4
PT 24	10	6	6	6	2	29,0
PT 25	10	12	6	6	2	38,5
PT 26	10	2	2	6	2	19,3
PT 27	10	4	2	6	2	20,3
PT 28	10	6	2	6	2	23,0
PT 29	10	8	2	6	2	18,1

* bestimmt mit Hilfe der 2. Ableitung des UV-Spektrums der Konjugate zwischen 320 und 260 nm wie in Kapitel 2.2.1.4.1. beschrieben

2.2.1.3. Prüfung der Konjugate auf Reinheit

Die (Träger 1/ Trypsin)-Konjugate wurden mit Hilfe der Elektrofokussierung auf ihre Reinheit, d.h. in diesem Fall auf die Abwesenheit von nativem Trypsin untersucht. Bei diesem Verfahren wandert ein Trägerampholyt unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes in einer Gelschicht aus vernetztem Polyacrylamid. Der Trägerampholyt besteht aus einer Mischung von Polymeren mit Molmassen bis zu einigen tausend Dalton, die verschiedene Mengen an Amino- und Carboxylgruppen enthalten. So erhält man eine Mischung von Ampholyten mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten (IEP). Der Bereich in dem die IEPs liegen sollen, kann durch die Auswahl geeigneter Ampholyte beliebig festgelegt werden.

Die Ampholytmischung wird Trägerampholyt genannt, weil deren relativ kleine Moleküle wesentlich schneller im elektrischen Feld wandern als die Makromoleküle der aufgetragenen Probe. Zudem sind sie im großen Überschuß im Gel. Sie bestimmen daher jederzeit den pH-Wert an den Stellen, an denen sie sich befinden. Die Moleküle mit niedrigem IEP wandern zur Anode. Sie wandern so weit, bis ihre Nettoladung gleich Null wird. Wegen der hohen Pufferkapazität der Ampholyte stellt sich in ihrer Umgebung ein pH ein, der ihrem IEP entspricht. Entsprechend wandern Moleküle mit hohem IEP zur Kathode, bis ihre Nettoladung ebenfalls gleich Null geworden ist. So entsteht in der Gelschicht ein pH-Gradient, auf dem die zu untersuchende Substanz wandert, bis auch sie zum Ort ihres IEP gelangt ist. Nur an dieser Stelle ist die Substanz ungeladen, sie kann also nicht mehr im elektrischen Feld weiterwandern. Eine Diffusion in einen Bereich mit einem anderen pH-Wert führt zum Auftreten von Ladung und damit zum Wandern zurück zum Ort des IEP. Im Gegensatz zur Elektrophorese werden hier also scharfe Banden erhalten.

Von den zu untersuchenden Substanzen wurden 0,2-0,8 mg, je nach dem zu erwartenden Eiweißgehalt, in 7-10 µL Wasser gelöst. Davon wurden 5-7 µL auf das Gel aufgetragen. Nach einer Entwicklungszeit von ca. 3 h wurden die Substanzen mit Trichloressigsäure im Gel ausgefällt. Während der Entwicklung bei 4°C hielt ein Regler Strom und Spannung, und damit die an das Gel abgegebene Leistung konstant, um Überhitzungen im Gel zu vermeiden. Nach der Trennung und Fällung der Komponenten wurde mit Coomassie-Blau bzw. einem gleichwertigen Farbstoff angefärbt.

Träger 1 ist ein saurer Träger, auch das Konjugat mit Trypsin hat noch einen niedrigen IEP, wohingegen das native Trpsin einen IEP im schwach alkalischen Bereich hat. Mögliche Verunreinigungen der Konjugate mit freiem Enzym waren daher gut erkennbar.



Abb. 6: Analyse der Konjugate PT 8, PT 7, PT 5, PT 6 und PT 9
(von oben nach unten) durch Elektrofokussierung
(Serva-Fertigplatte pH 3 - 10)

Abb. 6 zeigt eine solche Analyse durch Elektrofokussierung. Es sind die Konjugate PT 8, PT 7, PT 5, PT 6 und PT 9 - von oben nach unten - aufgetragen worden. Links war die Kathode, hier war der alkalische Bereich der entwickelten Gelplatte. Rechts waren entsprechend die Anode und der saure Bereich. Die Konjugate sind zur Anode gewandert, soweit die Moleküle nicht auf der etwas links von der Mitte der Abbildung befindlichen Startlinie geblieben sind. Dies kann vorkommen, wenn die aufgetragenen Eiweiß- bzw. Konjugatmoleküle zu groß für das Netzwerk des Trägergels der Platte sind. Am Orte des IEP der Konjugate sind diese im Gel ausgefallen, ihre Löslichkeit ist im sauren Bereich stark vermindert. Man erkennt deutlich die Heterogenität der Produkte. Sie zerfallen in mehrere Fraktionen mit unterschiedlichen IEPs. Eigentümlicherweise sind bei zwei Konjugaten, PT 5 und PT 6, nicht so viele Fraktionen erkennbar. Bei diesen beiden ist auf der linken Seite der Abbildung erkennbar, daß sie noch ein wenig freies Trypsin enthalten.

2.2.1.4 Charakterisierung der Konjugate

2.2.1.4.1. Bestimmung des Eiweißgehaltes

Ein bei unlöslichen immobilisierten Enzymen weit verbreitetes Verfahren zur Bestimmung des Eiweißgehaltes beruht darauf, daß der nach der Reaktion mit dem reaktiven Polymer in Lösung verbleibende Eiweißanteil bestimmt wird. Durch Differenzbildung zur eingesetzten Enzymmenge ergibt sich die gebundene Menge. Das bei dieser Methode vielfach angewendete Reagenz nach Folin-Ciocalteu ergibt aber mit vielen Substanzen Farbreaktionen, so daß bei löslichen Konjugaten möglicherweise der polymere Träger, der sich in diesem Falle in der zu untersuchenden Lösung befinden würde, stören könnte. Das in der Diplomarbeit angewendete Verfahren der Bestimmung des Eiweißgehaltes über den elementaranalytisch bestimmten Stickstoffgehalt war nicht sehr genau. Es sollte daher durch ein anderes Verfahren ersetzt werden. Die direkte Analyse der Polymer-Enzym-Konjugate mit einem Aminosäureanalysator nach saurer Hydrolyse war in unserem Hause nicht möglich.

Stattdessen bestand die Möglichkeit der Bestimmung des Eiweißgehaltes der löslichen Konjugate mit Hilfe der Derivativspektroskopie. Diese stellt ein noch immer wenig angewandtes Analyseverfahren dar, obwohl sie schon vor ungefähr 30 Jahren zur Untersuchung der Beziehung zwischen der Anzahl von Ionen einer bestimmten Sorte, hergestellt durch Beschuß mit Elektronen, und der Energie dieser Elektronen eingeführt worden ist (79). Ein wesentlicher Grund dafür war das Fehlen geeigneter Geräte. Erst seit wenigen Jahren sind preisgünstige Photometer erhältlich, die mit Hilfe der modernen Elektronik in der Lage sind, die erste, zweite, oder auch höhere Ableitungen aufzuzeichnen. Dennoch sind Veröffentlichungen über diese Analyse-methode noch immer selten. Für die vorliegende Arbeit wurde das Photometer 555 der Firma Perkin-Elmer verwendet, diese Firma bietet auch Informationen zur Theorie und Anwendung der Derivativspektroskopie an (80).

In den Ableitungsspektren werden keine Absorptionswerte aufgezeichnet, sondern Steigungswerte der Absorptionskurven. Je höher die Extinktion des Absorptionsmaximums einer Bande ist, desto steiler ist der Anstieg des

Peaks und desto größer ist der Wert der dazugehörigen Ableitung. Entsprechend steil ist dann meist auch der Abfall des Peaks und die entsprechende Ableitung ist stark negativ. Neben den Positionen der Extrema der Ableitungsspektren ist auch das Verhältnis der Minima und Maxima zueinander eine charakteristische Größe. Da bei gegebener Substanz und Wellenlänge die Höhe eines Peaks abhängig von der Substanzmenge ist, ist auch die Größe der Differenz der Extremwerte der Ableitung ein Maß für die vorliegende Substanzmenge. Die Größe des Ableitungspeaks ist aber nicht nur von der Substanzmenge abhängig, sondern auch von der Schreibergeschwindigkeit, der Dämpfung und der Spaltbreite des Photometers. Die drei zuletzt genannten Parameter müssen also konstant gehalten werden.

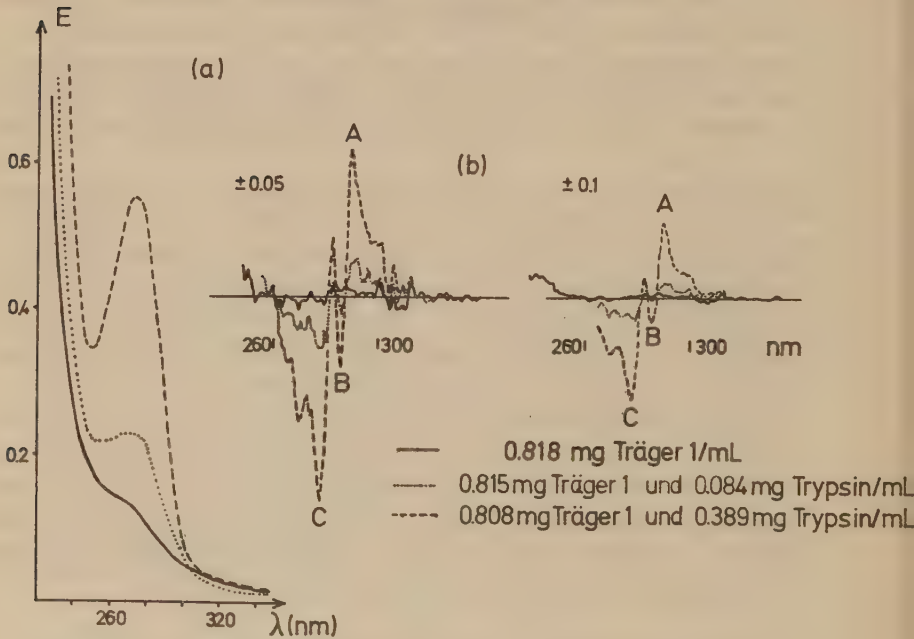


Abb. 7: Vergleich von Ausgangsspektrum (a) und 2. Ableitung (b) für Trägers 1 und Trägers 1/Trypsin-Mischungen im Bereich 340-240 nm (2. Ableitung mit 2 verschiedenen Bereichen der Spreizung in Ordinatenrichtung)

Zur Auswertung von Ableitungsspektren werden zwei in Abszissenrichtung nicht zu weit auseinanderliegende, in Ordinatenrichtung möglichst unterschiedliche Extrema herangezogen.

In Abb. 7 sind einige Derivativspektren und das dazugehörige Ausgangsspektrum dargestellt. Im Absorptionsspektrum sieht man, daß der Peak der aromatischen Aminosäuren des Eiweißes seitlich dem Peak des Polymeren aufsitzt. Der vom polymeren Träger verursachte Untergrund ist nicht konstant, mit steigendem Eiweißgehalt der Konjugate wird er kleiner und umgekehrt. In der zweiten Ableitung des Spektrums ist das Polymer im betrachteten Bereich nicht mehr erkennbar, die schwachen sichtbaren Signale entstammen dem Rauschen des Photometers. Dafür erscheint ein charakteristisches Signal für den Eiweißanteil. Das Signal des Polymeren wird in der zweiten Ableitung eliminiert, da der Anstieg des Peaks des Trägers im betrachteten Bereich im wesentlichen gleichmäßig ist, d.h. die erste Ableitung des Polymerenspektrums liefert einen konstanten positiven Wert, der bei abermaliger Ableitung gleich Null wird. Aus dem gleichen Grunde werden Derivativspektren auch durch Trübungen der Probenlösung nicht gestört. Trübungen verursachen im allgemeinen einen gleichmäßigen Extinktionsanstieg zu kürzeren Wellenlängen hin. Ihr Einfluß auf das Spektrum wird daher bei zweimaliger Ableitung ebenfalls eliminiert.

Wird nun die zweite Ableitung des Spektrums einer Anzahl von Lösungen mit bekannter Trypsinkonzentration aufgenommen, so werden Geraden sowohl bei der Auswertung der Strecke AB als auch der Strecke AC (Abb. 7) erhalten. Beide liefern ähnliche Werte für den Eiweißgehalt der untersuchten Konjugate. Im weiteren wurden die über den Abstand AB ermittelten Werte eingesetzt, da das Peakminimum und-maximum möglichst benachbart sein sollten (80). Mit Hilfe der Eichgeraden (Abb. 8) wurde der Eiweißgehalt der verschiedenen (Träger 1/Trypsin)-Konjugate bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 aufgeführt.

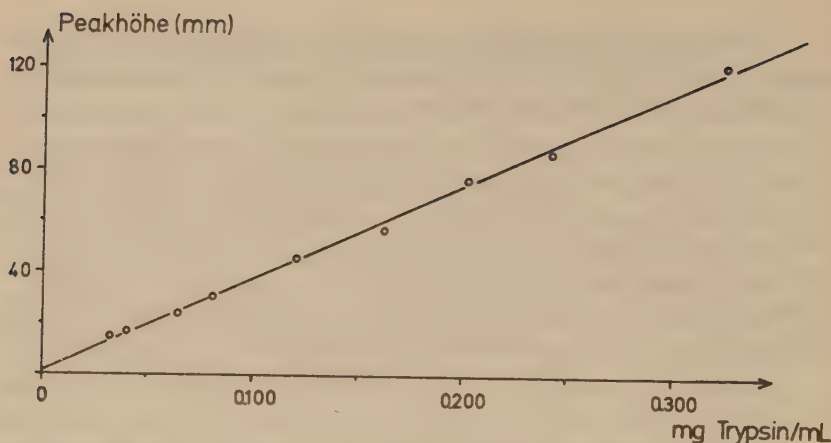


Abb. 8: Beispiel für eine Eichgerade zur Bestimmung des Trypsingehaltes von (Träger 1/Trypsin)-Konjugaten mit Hilfe der Derivativspektroskopie (2. Ableitung, Strecke AB in Abb. 7)

Für einen Fall, für das Konjugat PT 19, wurde als Vergleich zur Derivativspektroskopie der Eiweißgehalt über den elementaranalytisch bestimmten Stickstoffgehalt berechnet. Für die nach einer Dialyse gründlich getrocknete Substanz wurde ein Stickstoffgehalt von 10,68 % gefunden. Zusammen mit dem N-Gehalt von 8,0 % des Trägers und 15,2 % N im Trypsin läßt sich ein Eiweißgehalt von 37,3 Gew.% berechnen. Dieser Wert stimmt recht gut mit dem photometrisch ermittelten Gehalt von 40,6 Gew.% überein.

2.2.1.4.2 Bestimmung der enzymatischen Aktivität

Die enzymatische Aktivität der (Träger 1/Trypsin)-Konjugate wurde teils titrimetrisch, teils photometrisch untersucht. Das titrimetrische Verfahren wurde im Verlauf der Arbeit aufgegeben, da die Adsorption von polymeren Substanzen auf den Elektroden zu Veränderungen der Elektroden Eigenschaften geführt hatte, was eine häufige Reinigung der Elektroden erforderte. Demgegenüber war das photometrische Verfahren weniger aufwendig und störungsanfällig.

Zur Bestimmung der Aktivität von Trypsin wurde das Substrat N^α-Benzoylargininäthylester (BAEE) eingesetzt. Es wurde die durch die Spaltung des Esters entstehende Säure titriert bzw. der Extinktionsanstieg verfolgt. Das pH-Optimum der Aktivität des freien Trypsins liegt bei pH 8,5. Bei diesem Wert wurden auch die Aktivitäten der Konjugate bestimmt. Das Substrat BAEE zeigt unter diesen Bedingungen allerdings schon eine nicht zu vernachlässigende Eigenhydrolyse, die für jede Messung berücksichtigt werden mußte. Da bei der titrimetrischen Aktivitätsbestimmung die Messung der Eigenhydrolyse sehr lange gedauert hätte, wurde hier mit Eichgeraden für die jeweiligen Bedingungen der Messungen gearbeitet. Die photometrische Messung erlaubte eine schnelle Bestimmung der Eigenhydrolyse separat vor jeder Messung. Auf diese Art und Weise wurden auch möglicherweise noch vorhandene Verunreinigungen der Meßvorrichtung aus vorhergehenden Messungen erfaßt. Dadurch mögliche Fehler konnten also vermieden werden.

Die Konzentration des Substrates lag mit 0,01 Mol/l so hoch, daß die Michelis-Konstante k_M klein war gegen die Substratkonzentration c_S und die Michaelis-Menten-Gleichung

$$v = \frac{v_{\max} \cdot c_S}{k_M + c_S} \quad \text{vereinfacht werden konnte zu}$$

$v \approx v_{\max}$: Die Geschwindigkeit der enzymatischen Umsetzung v hatte ihren maximalen Wert $v_{\max}$ erreicht.

Es wurde die Anfangsaktivität der jeweiligen Probe bestimmt, die Angabe der Ergebnisse erfolgt in μMol Substratumsatz pro Minute ($\hat{=}$ 1 Internationale Einheit/l U) und pro Milligramm Konjugat. Die Angabe der relativen Aktivität dient dem Vergleich von gebundenem und freiem Enzym.

Im Laufe der Untersuchungen wurden zwei Trypsinchargen unterschiedlicher Aktivität eingesetzt. Die eine Charge hatte eine Aktivität von 45,4 U/mg, die andere eine von 29,5 U/mg. Die zugehörigen Konjugate sind in Tabelle 9 mit a bzw. b gekennzeichnet.

Die Reproduzierbarkeit der Kupplungsreaktionen war nicht sehr gut. Dies zeigt sich an den Ergebnissen der Bestimmung des Eiweißgehaltes und der Aktivität. Daher wurden für vergleichende Untersuchungen jeweils neue

Konjugatreihen dargestellt. Die dargestellten Konjugate sind in Tabelle 9 aufgeführt. Um die Aktivität dieser Konjugate unabhängig von ihrem Eiweißgehalt miteinander vergleichen zu können, wird dort die relative Aktivität angegeben. Diese vergleicht die Aktivität des gebundenen Enzyms mit der gleichen Menge des freien Enzyms, sie wird angegeben als Prozentsatz der nach der Umsetzung noch erhaltenen Aktivität.

Der Untersuchung der enzymatischen Aktivität in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis der drei Komponenten Polymer, Kuppler und Enzym dienen die Konjugate PT 1 - PT 4. Weitere, hier nicht angeführte Konjugate bestätigen die aufgefundenen Ergebnisse. Wird bei konstanten Mengen an eingesetztem Träger und Trypsin die CDI-Menge erhöht, sinkt die relative Aktivität deutlich von 56,2 % auf 21,5 %, wobei die Menge an gebundenem Enzym annähernd gleich bleibt (Tabelle 9 und Abb. 9). Der reichlich angebotene Kuppler vermag nicht nur das Enzym mehrfach an das Polymer zu binden, auch Enzym-Enzym-Bindungen sind möglich. Letztere können entweder innerhalb eines Eiweißmoleküls oder seitlich zum benachbarten Molekül entstehen, so daß die Enzymmoleküle am Träger vernetzen. Denkbar ist auch, daß eine zweite Schicht von Eiweißmolekülen gebunden wird. Aufgrund des Enzymgehaltes von ungefähr 35 % ist eher zu vermuten, daß Quervernetzungen aufgetreten sind, diese führen zu einer Versteifung der Proteine, deren Beweglichkeit und damit auch Erreichbarkeit durch das Substrat eingeschränkt wird.

Tabelle 9

Aktivität der (Träger 1/Trypsin)-Konjugate

Konjugat	Eiweißgehalt (Gew.%)	Aktivität (U/mg Konj.)	relative Aktivität (%)	Trypsin charge ^{a)}
PT 1	33,7	8,6	56,2	a
PT 2	37,5	8,2	48,2	a
PT 3	32,8	3,8	25,5	a
PT 4	31,8	3,1	21,5	a
PT 5	8,9	1,3	49,5	b
PT 6	14,6	2,4	55,7	b
PT 7	10,7	1,8	57,0	b
PT 8	12,9	2,8	73,6	b
PT 9	34,8	4,6	44,8	b
PT 10	8,6	1,3	51,2	b
PT 11	16,9	2,7	54,2	b
PT 12	30,5	5,1	56,7	b
PT 13	33,7	7,3	47,7	a
PT 14	36,5	8,1	48,9	a
PT 15	36,7	8,7	52,2	a
PT 16	17,5	2,1	40,7	b
PT 17	20,3	3,0	50,1	b
PT 18	39,2	5,4	46,7	b
PT 19	40,6	6,7	36,0	a
PT 20	34,0	6,9	44,7	a
PT 21	49,2	12,2	54,2	a
PT 22	52,2	10,6	44,2	a
PT 23	43,4	8,0	40,5	a
PT 24	29,0	6,9	51,8	a
PT 25	38,5	7,9	44,7	a
PT 26	19,3	4,1	46,7	a
PT 27	20,3	3,8	40,4	a
PT 28	23,0	3,8	36,0	a
PT 29	18,1	2,3	27,8	a

a) Charge a: 45,4 U/mg; Charge b: 29,5 U/mg

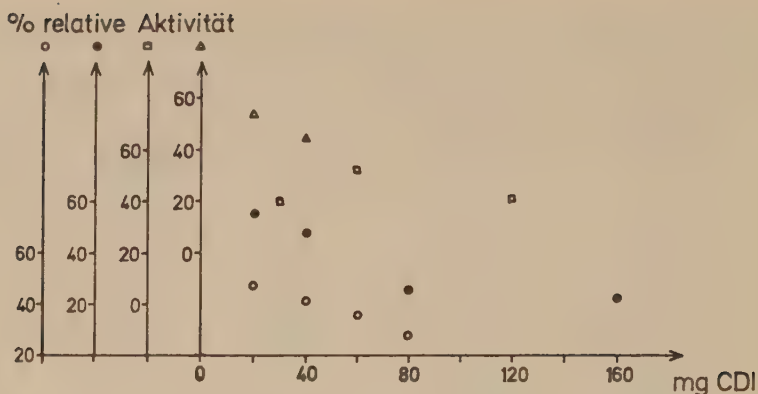


Abb. 9: Abhängigkeit der relativen Aktivität verschiedener Konjugate vom Mengenverhältnis an eingesetztem Trypsin und CDI bei konstanter Trägereinwaage (o : 20 mg Trypsin; • : 40 mg Trypsin; □ : 60 mg Trypsin; ▲ : 80 mg Trypsin, jeweils mit 100 mg Träger 1)

In der analogen Reihe PT 7 - PT 9 ist diese Abnahme der relativen Aktivität bei wachsendem Verhältnis von CDI zu Trypsin nur bei PT 7 und PT 9 zu erkennen. Das Konjugat PT 8 verhält sich deutlich anders. Eine Ursache hierfür kann nicht angegeben werden.

Die Abhängigkeit der Aktivität der gebundenen Enzyme vom pH-Wert im Ansatz für die kovalente Kupplung wurde mit Hilfe der Substanzen PT 2 und PT 15-17 untersucht. Der betrachtete pH-Bereich umfaßt pH 5 bis pH 7. In diesem Bereich sind sowohl der Eiweißgehalt als auch die relative Aktivität der Konjugate sehr ähnlich. Es wurde also kein Einfluß des Kupplungs-pH-Wertes auf die enzymatische Aktivität der Konjugate beobachtet. In einem weiteren Vergleich wurden diejenigen Konjugate untersucht, die durch Umsetzung bei pH 3 und pH 6 dargestellt worden sind. Beim höheren pH-Wert wurden 50 % relative Aktivität gefunden, beim niedrigeren nur 40 %. Die Differenz ist nicht sehr groß. Es wäre bei dem niedrigeren pH-Wert aber eine höhere relative Aktivität zu erwarten gewesen, da Trypsin bei pH 3 lange stabil bleibt. Es ist im sauren Bereich inaktiv und kann daher keine Autolyse erleiden. Die Reaktionszeit hat ebenfalls keinen erkennbaren Einfluß auf die Aktivität der Produkte.

Die Konjugate PT 2 und PT 18, deren Reaktionszeit 2 bzw. 18 h betrug, sind sich sehr ähnlich. Die relativen Aktivitäten der ca. 48 h umgesetzten Produkte PT 9, PT 12 und PT 19 streuen stark, obwohl das Mengenverhältnis der Umsetzungskomponenten im Ansatz in allen Fällen das gleiche war. Sie lassen daher auch keine Aussage über den Einfluß der Reaktionsdauer zu. Man erkennt aber, daß, wie allgemein beobachtet, mit steigendem Enzymgehalt die relative Aktivität sinkt. Als Ursache kann, ähnlich wie auch bei den Umsetzungen in Gegenwart von viel Carbodiimid, eine gegenseitige Behinderung der Enzymmoleküle im Konjugat angenommen werden.

Alle Enzym-Polymer-Konjugate entsprechen in ihrer Zusammensetzung ungefähr derjenigen des Reaktionsansatzes. Da die relative Aktivität der Produkte sowohl vom pH des Kupplungsansatzes als auch von der Umsetzungszeit unabhängig ist, kann man annehmen, daß die Kupplungsreaktion recht schnell abläuft. Nach der Bindung des Enzyms an das Polymer ist es weitgehend vor weiteren, die Aktivität mindernden, Angriffen geschützt. Wie noch gezeigt werden wird, sind alle Konjugate stabiler als das native Trypsin. Die Polymerkette schützt das Enzym in gewissem Maße dadurch, daß anderen Trypsinmolekülen der Zutritt verwehrt wird, und die eingeschränkte Beweglichkeit der gebundenen Enzymmoleküle verhindert eine gegenseitige Inaktivierung durch Autolyse. Die Fixierung an Polymeren senkt natürlich auch die Aktivität gegenüber angebotenen Substraten. Niedermolekulare Substrate sind wesentlich beweglicher als Makromoleküle, sie gelangen gut zum Enzym und werden daher weiterhin relativ schnell umgesetzt. Makromolekulare Substrate können die aktiven Zentren der gebundenen Enzyme deutlich schlechter erreichen. Für das Konjugat PT 19 wurde die Aktivität mit Casein als Substrat nach einem von D.M. Krämer et al. (81) beschriebenen und etwas modifizierten Verfahren bei pH 8 und 25°C titrimetrisch bestimmt. Die bei der Spaltung der Aminosäurekette des Caseins in Peptide entstehenden freien Carboxylgruppen wurden mit Natronlauge titriert. Dabei wurde für Trypsin gefunden, daß 9,5 μMol Peptidbindungen pro Minute und mg Enzym gespalten worden sind. PT 19 spaltete 0,71 μMol Peptidbindungen/min $\cdot$ mg Konjugat, bezogen auf 1 mg gebundenes Enzym entspricht dies 1,75 $\mu\text{Mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$, was wiederum einer relativen Aktivität von 18,4 % entspricht. Die relative Aktivität gegenüber dem niedermolekularen BAEE betrug 36,0 %, d.h. der

Einsatz des polymeren Substrates Casein führt zu einer Halbierung der relativen Aktivität. Die Werte unlöslicher Trypsin-Immobilisate sind deutlich geringer, so fand z.B. H.G. Vogt maximal 2,5 % relative Aktivität gegenüber Casein, in den meisten Fällen sogar wesentlich weniger (65). A. Bar-Eli und A. Katchalski fanden für ein mit einem Polytyrosylrest modifiziertes Trypsin, das an ein Copolymer aus DL-Phenyldiazoniumsalz und L-Leucin gebunden war, gegenüber Casein ein sechstel der Aktivität, die gegenüber einem niedermolekularen Substrat gefunden wurde (82). R.L. Foster fand für sein wasserlösliches Trypsin-Dextran-Konjugat nur 4 % der Aktivität des freien Enzyms (30).

2.2.1.4.3 pH-Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität

Die Enzyme zeigen eine Abhängigkeit ihrer Aktivität vom pH-Wert der sie umgebenden Lösung, da die Substrate im allgemeinen über geladene Gruppen des aktiven Zentrums gebunden werden. Der pK_s -Wert dieser Gruppen bestimmt die Anzahl möglicher Substratbindungsstellen, die pH-abhängig ist. An unlösliche Polyelektrolyte gebundene Enzyme zeigen oft eine Verschiebung ihrer pH-Aktivitäts-Kurve, verglichen mit den nativen Enzymen. Die geladenen Träger schaffen eine Mikroumgebung, deren pH von dem der übrigen Lösung verschieden sein kann. So werden Polycarbonsäuren in neutralen oder schwach alkalischen Lösungen, z.B. bei pH 8,5, dem pH-Optimum von nativem Trypsin, weitgehend in Form ihrer Anionen vorliegen, die aus der Lösung Protonen anreichern. Es entsteht eine saure Mikroumgebung am Polymeren. Erst bei stärker alkalisch reagierender Außenlösung stellt sich auch am Polymeren ein pH-Wert ein, der dem Optimum von 8,5 entspricht. Mit den gebräuchlichen Methoden kann aber nur in der Außenlösung der pH-Wert gemessen werden. So wird eine Verschiebung des pH-Optimums der Enzymaktivität beobachtet. Auch die Anreicherung des Produktes, falls dieses eine Säure oder eine Base ist, in der Nähe des immobilisierten Enzyms verändert den pH-Wert der Mikroumgebung. So berichteten R. Axén und S. Ernbach über ein sehr aktives, unlöslich immobilisiertes Chymotrypsin, das aus N-Acetyl-tyrosinäthylester die Säure und damit Protonen schneller freisetzte als durch Diffusion abwandern konnten (83).

Die Anwesenheit von Puffersubstanzen vermag die Verschiebung des Optimums dadurch zumindest zu verringern, daß die Protonen in der Umgebung des Polymeren gebunden werden. Darüber hinaus nehmen J.M. Engasser und C. Horvath (84) auch die Möglichkeit eines Protonentransportes durch Puffersubstanzen an. Diese Möglichkeit besteht auch über den Pufferbereich hinaus. Der Transport wird mit steigendem pH-Wert schneller. Er läuft über protonierte Pufferanionen, für die ein Konzentrationsgefälle in die umgebende Lösung hinein besteht.

Verschiebungen der pH-Aktivitätskurve wurden auch bei Enzymen beobachtet, die an ungeladene Träger gebunden waren. Dies wird auf die für die Immobilisierung angewendeten Reaktionen zurückgeführt, indem z.B. die Anzahl der geladenen Gruppen im Enzym verändert wird (85). Verschiebungen des pH-Optimums aufgrund chemischer Modifikation werden durch eine Erhöhung der Ionenstärke nicht beseitigt. So fand R.L. Foster für ein wasserlösliches Trypsinkonjugat mit Polyaldehyddextran eine Verschiebung der pH-Aktivitätskurve um eine Einheit in den alkalischen Bereich auch bei hoher Ionenstärke, die zum kleineren Teil auf die chemische Modifikation des Trypsins und überwiegend auf einen Matrixeffekt zurückgeführt wurde (30). Neben diesen Beispielen gibt es viele Fälle, in denen bei positiv oder negativ geladenen Trägern ebenso wie auch bei neutralen Trägern keine Verschiebung der pH-Aktivitäts-Kurve beobachtet worden ist. Dies ist vermutlich auf die Wirkung gegensätzlicher Effekte zurückzuführen (15).

Für zwei (Träger 1/Trypsin)-Konjugate wurde die Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert der Substratlösung untersucht (Abb. 10). Als Vergleich dazu wurde unter den gleichen Bedingungen auch das Verhalten von Trypsin untersucht. Bei den Konjugaten handelte es sich um PT 19, das 40,6 % Eiweiß enthielt und um PT 10, das nur 8,6 % Eiweiß enthielt. Die Kurven aller drei Substanzen zeigen einen ähnlichen Verlauf. Ein optimaler pH-Wert für die enzymatische Umsetzung von BAEE ist nicht erkennbar. Ungefähr ab pH 8,5 hat die Aktivität ihren maximalen Wert erreicht, ihre bei steigenden pH-Werten in einzelnen Fällen zu beobachtende leichte weitere Erhöhung liegt innerhalb des Streubereichs der Meßwerte. Die hohe Beweglichkeit

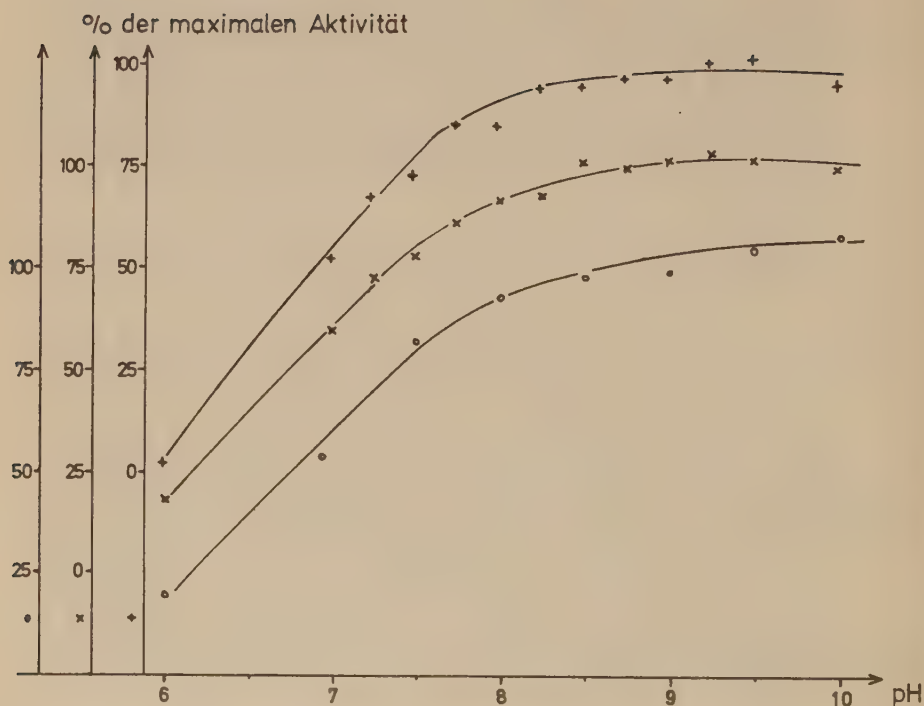


Abb. 10: Abhängigkeit der Aktivität der Konjugate PT 10 (+), PT 19 (x) und des Trypsins (o) vom pH-Wert der Lösung (optisch bestimmt in 0,01 M BAEE, 0,1 M Tris, 0,2 M NaCl bei 25°C)

der Konjugate in der Lösung verhindert eine Anreicherung von Protonen am Polymeren und es bildet sich am Träger keine Mikroumgebung mit einem pH-Wert, der von dem der übrigen Lösung abweicht. Auch das Polymer scheint keinen Einfluß auf die pH-Aktivitäts-Kurve zu haben, wie es R.L. Foster beschrieben hatte, wenn auch der Einfluß gegensätzlicher Effekte, wie oben erwähnt, nicht auszuschließen ist.

2.2.1.4.4 Untersuchung der Lagerstabilität der (Träger I/Trypsin)-Konjugate

Zur Untersuchung der Langzeitstabilität verschiedener (Träger I/Trypsin)-Konjugate wurden Proben dieser Konjugate sowohl in Wasser als auch in Tris-Puffer vom pH 8,5 gelöst und zum Teil über mehrere Wochen bei Raumtemperatur oder 5°C aufbewahrt. In einzelnen Fällen wurden die MeBreihen durch Pilzbefall beendet. In trockenem Zustand hielten sich die Konjugate, soweit sie untersucht worden sind, über mehrere Jahre ohne Aktivitätsverlust.

Der pH 8,5 wurde gewählt, weil Trypsin in diesem Bereich sein Aktivitätsmaximum hat. Aktivitätsverluste, z.B. durch Autolyse, ließen sich also schneller als bei niedrigeren pH-Werten erkennen. Als Beispiele seien die Konjugate PT 10 - PT 12 und PT 16 - PT 18 sowie PT 19 angeführt. Letzteres erwies sich als besonders stabil, es ist daher eingehender als die übrigen Konjugate untersucht worden. Aus einer größeren Anzahl von Stabilitätsuntersuchungen sind nur einige als Beispiele angeführt worden.

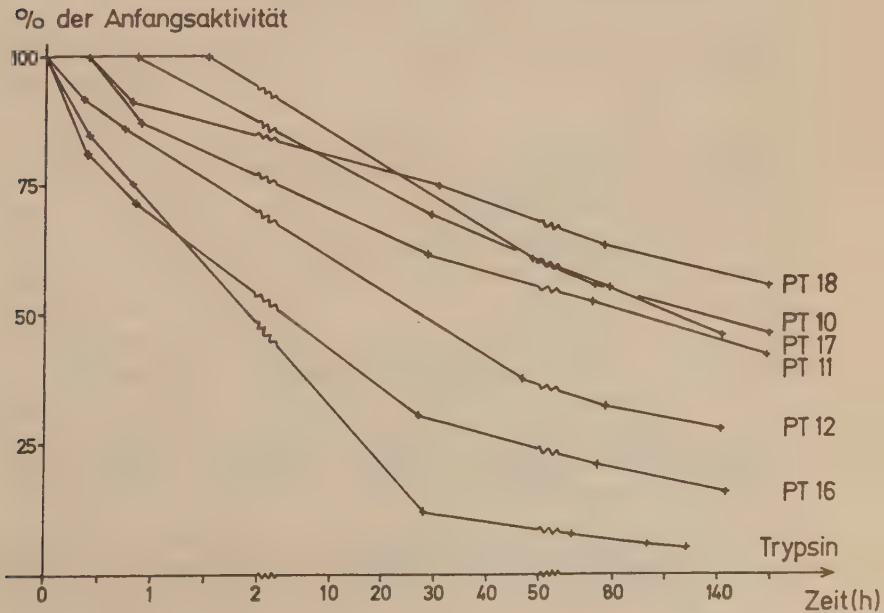


Abb. 11: Lagerstabilität der Konjugate PT 10 - PT 12, PT 16 - PT 18 und von nativem Trypsin bei pH 8,5 und Raumtemperatur

Die Kurven in Abb. 11 zeigen die Stabilität des gebundenen Trypsins in verschiedenen Ansätzen im Vergleich zum nativen Enzym bei Raumtemperatur und in Trispuffer. Die durch die kovalente Bindung an einen polymeren Träger erreichte Stabilisierung des Trypsins ist klar zu erkennen. Nur das Produkt PT 16 ist dem freien Enzym bezüglich seiner Stabilität recht ähnlich. PT 16 ist das Vergleichs-Konjugat zu PT 17, die Kupplungsreaktion von ersterem fand bei pH 3 statt, von letzterem bei pH 6. PT 16 zeigte auch schon eine deutlich geringere relative Aktivität als PT 17 (Tabelle 9). Dies ist ein weiteres Zeichen dafür, daß die Kupplungsreaktion bei pH 3 ungünstig verläuft. Dies steht im Widerspruch zur hohen Stabilität von Trypsin bei niedrigen pH-Werten. Bei der Kupplung an einen polymeren Träger unter sauren Bedingungen ist eine geringere Schädigung des Enzyms durch Autolyse während der Kupplung zu erwarten als im Neutralbereich. Dennoch ist die enzymatische Aktivität durch Bindung im sauren Bereich stärker herabgesetzt

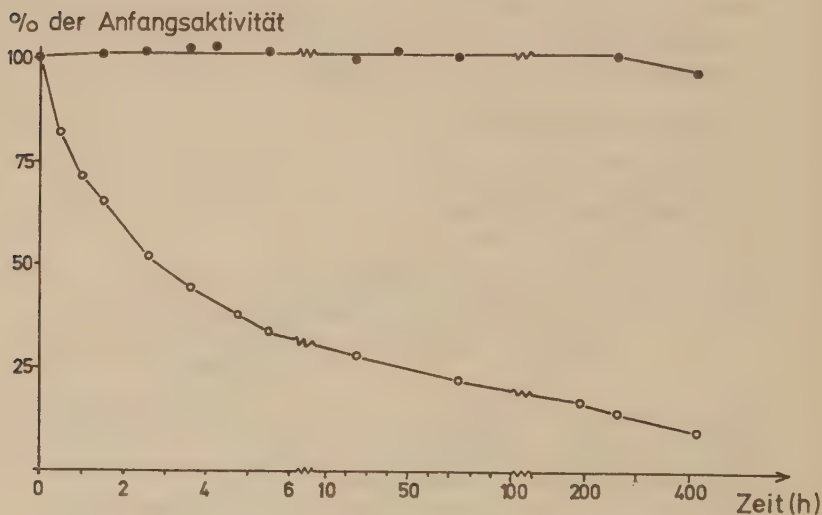


Abb. 12: Vergleich der Lagerstabilität von PT 19 und Trypsin bei pH 8,5 (0,2 m Tris/0,4 m NaCl) und 5°C (● PT 19; ○ natives Trypsin)

als in den anderen Fällen. Die Bindung des Enzyms an den Träger scheint hier ungünstiger zu sein. Denkbar ist auch, daß bei der Umsetzung bei niedrigerem pH-Wert die Enzymmoleküle nur an wenige Carboxylgruppen des

Polymeren gebunden werden, so daß eine große Beweglichkeit erhalten bleibt, die die Autolyse auch von gebundenen Trypsinmolekülen begünstigt.

Abb. 12 zeigt den Vergleich der Lagerstabilität von PT 19 und Trypsin. Die Substanzen waren ebenfalls in Trispuffer (pH 8,5) gelöst und wurden bei 5°C gelagert. PT 19 zeigt bemerkenswerterweise erst nach fast zwei Wochen einen leichten Abfall der Aktivität.

Es zeigte sich damit, daß durch die kovalente Bindung von Trypsin an lösliche Träger Präparate gewonnen werden konnten, die weit stabiler als das native Enzym waren.

2.2.1.4.5 Untersuchung der Thermostabilität der (Träger 1/Trypsin)-Konjugate

Neben der Lagerstabilität von polymergebundenen Enzymen, die auch Rückschlüsse auf das Verhalten bei kontinuierlicher enzymatischer Tätigkeit zuläßt, ist auch die Thermostabilität von Interesse. Für technische Prozesse ist es wichtig, die höheren Reaktionsgeschwindigkeiten bei höheren Temperaturen nutzen zu können. Für entsprechende Untersuchungen wurden die Konjugate PT 19 und PT 20 eingesetzt und mit dem nativen Enzym verglichen.

Die Ursache für die geringe Thermostabilität der meisten Enzyme liegt in der Abhängigkeit der Aktivität von einer ganz bestimmten Tertiärstruktur, die die Aminosäuren des aktiven Zentrums in einer Stellung zueinander hält, die allein die Bindung des Substrates und seine Umsetzung erlaubt. Diese Tertiärstruktur wird in der Regel zerstört, wenn das Eiweißmolekül aufgrund der erhöhten Temperatur in starke Bewegung gerät. Nur in wenigen Fällen vermag sich die durch Disulfidbrücken, Wasserstoffbrücken und polare und hydrophobe Wechselwirkungen zusammengehaltene Tertiärstruktur zurückzubilden. Normalerweise entsteht eine neue, inaktive Struktur. Die aktive Tertiärstruktur kann durch die Anwesenheit von Polymeren stabilisiert werden, indem z.B. eine Polymerkette an zwei oder mehrere Aminosäuren des Enzyms gebunden wird. Dadurch, daß einzelne Aminosäuren in ihrer Stellung zueinander stärker fixiert werden, bleibt auch die Tertiärstruktur des ganzen Enzyms stabiler. So ist in Abb. 13 deutlich zu erkennen, daß die Thermostabilität von PT 19 größer ist als die von Trypsin.

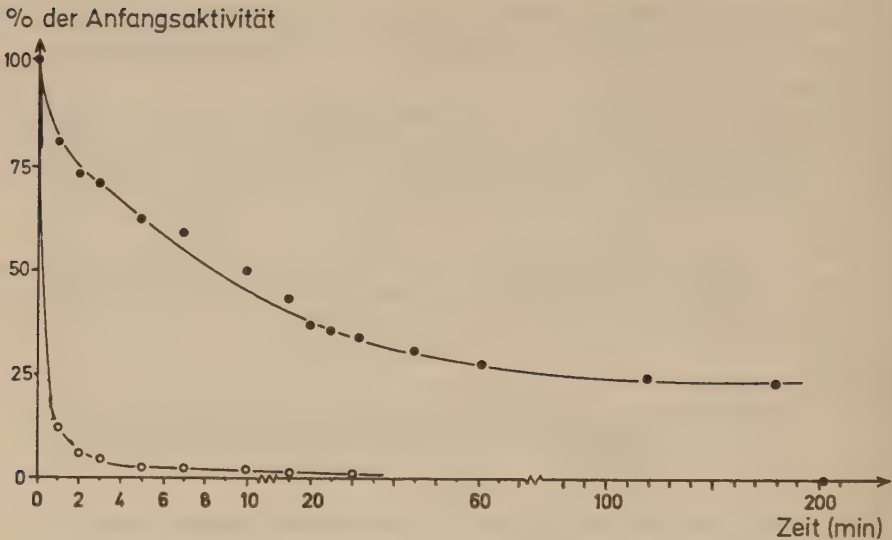


Abb. 13: Abhängigkeit der Aktivität von PT 19 und Trypsin von der Dauer der Erhitzung einer wäßrigen Lösung auf 60°C (● PT 19, o natives Trypsin)

Für die Messungen wurden die Proben der beiden Substanzen in Wasser gelöst und unter Schütteln möglichst schnell auf die Untersuchungstemperatur von 60°C gebracht. Die zu bestimmten Zeiten entnommenen Proben wurden schnell abgekühlt und in Eis gelagert, sofern ihre Aktivität nicht sofort bestimmt werden konnte. Die Aktivitätsbestimmungen wurden unter den üblichen Bedingungen bei pH 8,5 und 25°C mit BAEE als Substrat durchgeführt.

Die Thermostabilität von PT 20 wurde durch die Inkubation bei den Temperaturen 45°C, 60°C und 65°C untersucht (Abb.14). Während bei 25°C kein Aktivitätsverlust in dem betrachteten Zeitraum auftrat, war der Verlust bei 60°C erheblich. Nur noch 9,4 % der Anfangsaktivität waren nach zwei Stunden noch erhalten. Bei 65°C wurden nach zwei Stunden nur noch 5,8 % Restaktivität gefunden. Dennoch ist PT 20 wesentlich stabiler als das native Trypsin, dessen restliche Aktivität schon nach einer halben Stunde nur 1,3 % des Anfangswertes betrug (Abb. 11). Noch stabiler als PT 20 war

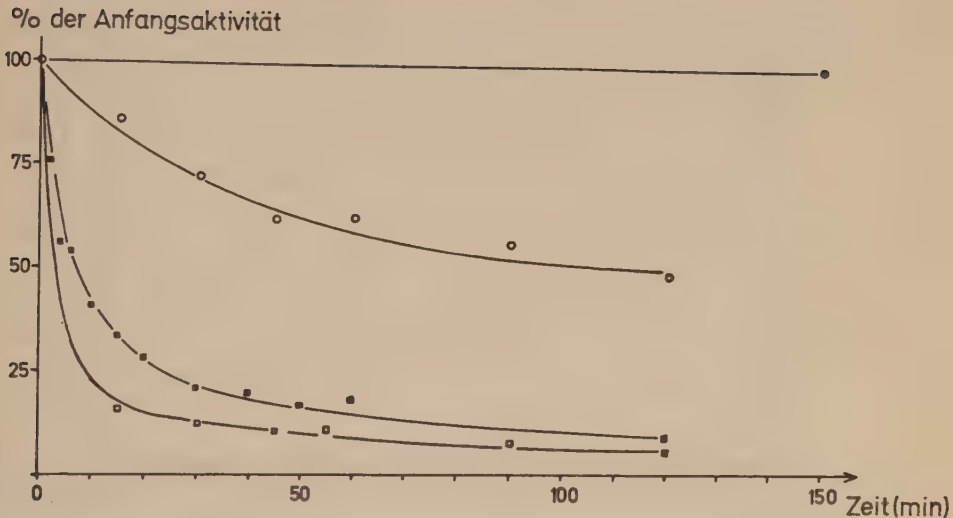


Abb. 14: Abhängigkeit der Aktivität von PT 20 in wäßriger Lösung von der Inkubationszeit und der Temperaturen (● 25°C; ○ 45°C; ■ 60°C; □ 65°C)

PT 19. Für diesen Unterschied der beiden Konjugate, die sich mit 40,6 % Eiweiß (PT 19) bzw. 34,0 % Eiweiß (PT 20) und 36,0 % bzw. 44,7 % relativer Aktivität doch recht ähnlich sind, kann keine Erklärung gegeben werden. Dieser Befund mag ein Hinweis auf die Schwierigkeit der Reproduzierbarkeit der Kupplungsreaktion von reaktiven Polymeren und Enzym sein.

Die Thermostabilität der Substanzen PT 19, PT 20 und Trypsin wurde sowohl in Wasser (pH der Lösung : 4,7-4,8) als auch in Acetatpuffer mit dem pH 4,9 untersucht (Abb. 15). In der Acetatlösung erwies sich PT 19 als besonders stabil. Nach 2 Stunden bei 60°C waren noch mehr als 70 % der Anfangsaktivität erhalten gegenüber weniger als 1 % beim freien Trypsin. Die Stabilität von PT 20 lag wieder zwischen derjenigen von PT 19 und Trypsin. In Abb. 16 sind noch einmal die Meßergebnisse für PT 19 und Trypsin in Wasser und Acetatlösung zusammengefaßt. PT 19 zeigte in wäßriger Lösung bei 60°C nach 2 Stunden noch 25 % Restaktivität, in der Acetatlösung mit

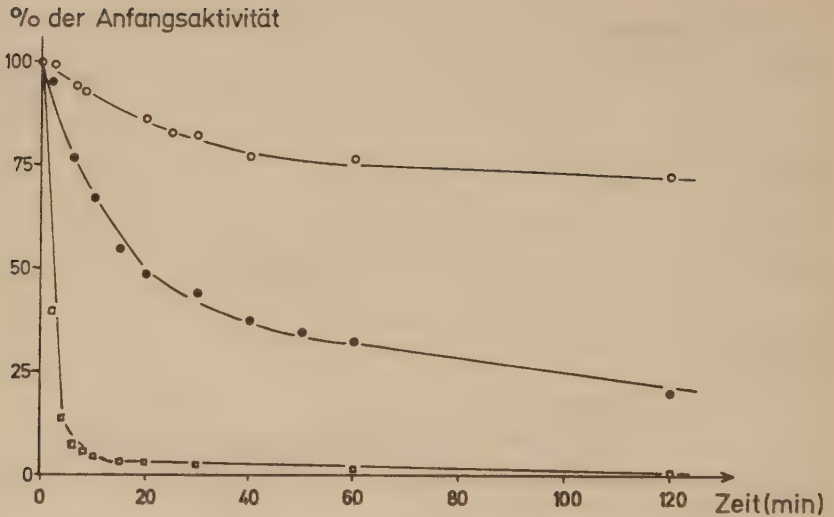


Abb. 15: Vergleich der Thermostabilität von PT 19, PT 20 und Trypsin im Acetatpuffer pH 4,9 bei 60°C. (o PT 19; ● PT 20; □ Trypsin)

dem pH 4,9, wie schon erwähnt, sogar noch über 70 %. Demgegenüber zeigte Trypsin in Acetatlösung nach 2 Stunden nur noch minimale Aktivität, in wäßriger Lösung war es nach dieser Zeit inaktiv.

Die Untersuchung der Thermostabilität von Trypsin ermöglicht auch Aussagen über den Denaturierungsmechanismus. Die nach einer bestimmten Inkubationszeit noch erhaltene Aktivität ist ein Maß für den noch aktiven Anteil des Enzyms. Trägt man den Logarithmus oder den Kehrwert der verbliebenen Aktivität gegen die Inkubationszeit auf, so erhält man Geraden, falls die Denaturierung des Enzyms einem Zeitgesetz der ersten oder der zweiten Ordnung gehorcht. Für die Denaturierung von Trypsin durch Autolyse ist zu erwarten, daß dieses eine Reaktion zweiter Ordnung ist. Bei unlöslich immobilisiertem Trypsin ist eine Autolyse der Trypsinmoleküle aufgrund deren räumlicher Trennung nicht mehr möglich. Denaturierungen können dann

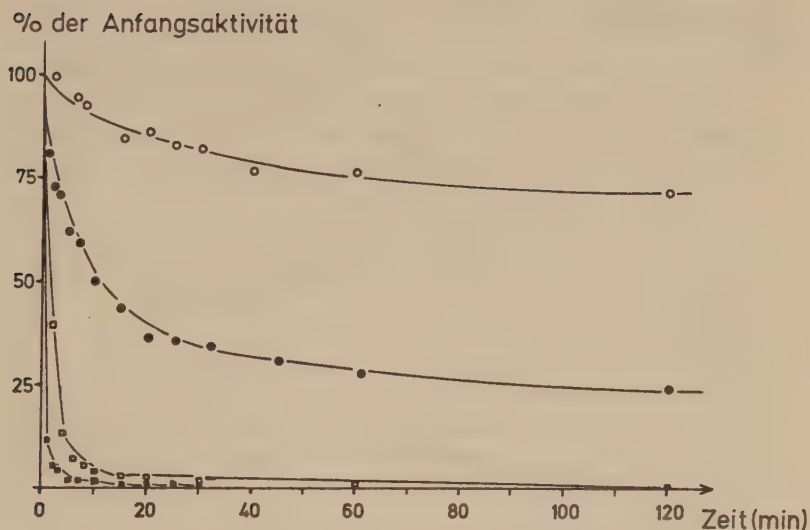


Abb. 16: Vergleich der Thermostabilität von PT 19 und Trypsin nach Inkubation bei 60°C in wäBriger Lösung und in Acetatpuffer pH 4,9 (o: PT 19 in Acetatlösung; ● : PT 19 in Wasser; □: Trypsin in Acetatlösung; ■: Trypsin in Wasser)

nur das Ergebnis von Veränderungen im Aufbau des Enzyms, z.B. Umwandlung in eine andere Tertiärstruktur, sein. In einem solchen Falle läge eine Reaktion erster Ordnung vor. Eine Umwandlung mehrerer Trypsinformen ineinander beschrieben D. Gabel und V. Kasche (86). Lösliche Trypsin-Polymer-Konjugate können wie das native Enzym durch Autolyse, wenn auch in vermindertem Maße, oder durch Konformationsänderungen inaktiviert werden. Auch letzteres wird langsamer als bei dem nativen Enzym ablaufen, da das Polymer eine zusätzliche Versteifung der ursprünglichen Struktur darstellt. Für natives Trypsin wurden Geraden gefunden, wenn die Auftragung der Meßwerte entsprechend einer Reaktion 2. Ordnung erfolgte. Nach ungefähr fünf Minuten Inkubationszeit war eine starke Änderung der Steigung der Geraden zu beobachten (Abb. 17). Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante sank von 0,17 mg/μmol auf 0,04 mg/μmol. Zu diesem Zeitpunkt war die Aktivität des Enzyms auf 2,4 % der Anfangsaktivität abgefallen. Für das Konjugat PT 19

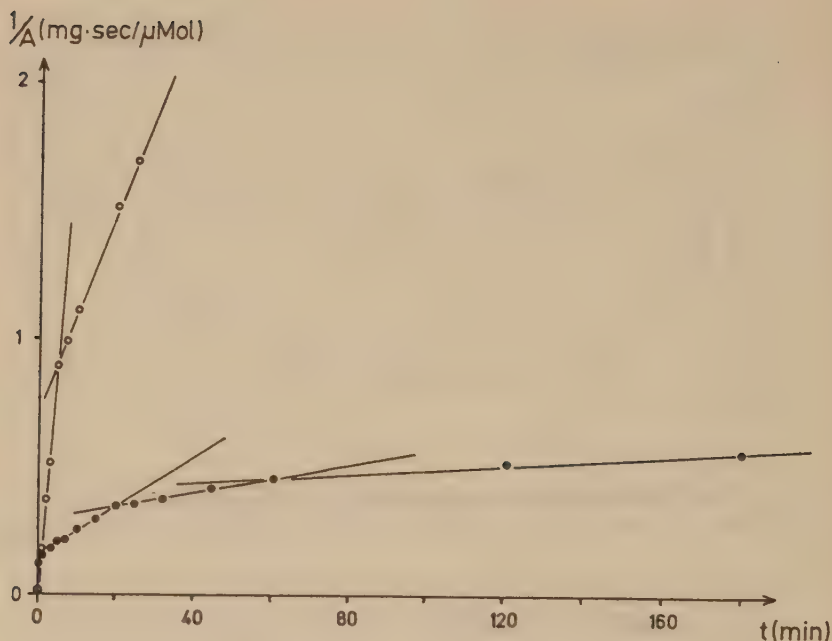


Abb. 17: Darstellung der Denaturierungsgeschwindigkeit (60°C , wäßrige Lösung) von nativem Trypsin (o) und von PT 19 (●) nach der Gleichung $1/A = 1/A_0 + kt$ (A : zur Zeit t vorhandene Aktivität von Trypsin als Maß für die verbliebene aktive Enzymmenge)

wurden bei einer Auftragung der Meßwerte, die bei der Untersuchung der Thermostabilität erhalten worden sind, ebenfalls mehrere Geschwindigkeitskonstanten für die Denaturierung gefunden. Eine Reaktion 2. Ordnung wurde für die ersten 20 Minuten beobachtet. Der Wert der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten betrug $0,01 \text{ mg}/\mu\text{mol}$. Für den Zeitraum zwischen 20 und 60 Minuten und ab 60 Minuten wurden weitere Geraden mit verschiedenen abnehmenden Steigungen gefunden. Eine Unterscheidung, ob eine Reaktion 1. oder 2. Ordnung oder ob eine Reaktion nicht ganzzahliger Ordnung vorlag, war hier nicht möglich. In Abb. 17 sind zwar die Meßwerte für eine Reaktion 2. Ordnung aufgetragen, man erhält aber ebenso Geraden für eine Auftragung

entsprechend einer Reaktion 1. Ordnung. Möglicherweise verlief die Denaturierung von PT 19 so, daß erst die am leichtesten zugänglichen und aktivsten Trypsinmoleküle angegriffen wurden und daß, nachdem die Autolyse im wesentlichen abgeschlossen war, andere Mechanismen der Denaturierung in den Vordergrund traten. Dabei werden auch die Art und das Ausmaß der Bindung des Enzyms an das Polymere von Bedeutung sein.

2.2.1.4.6 Betrieb von diskontinuierlichen und kontinuierlichen Enzymreaktoren

Eine Wiedergewinnung und Isolierung der Enzym-Polymer-Konjugate nach den Aktivitätsbestimmungen war nicht möglich. Die Trennung von Substrat und Puffer vom Konjugat wäre mit Hilfe von Dialyse, Gelfiltration und Membranfiltration möglich gewesen. Die Dialyse hätte zuviel Zeit erfordert, bei nur mäßiger Lagerstabilität der Konjugate hätten dadurch Aktivitätsverluste auftreten können. Bei der Gelfiltration hätten sich Schwierigkeiten bei der Erfassung desjenigen Eluates, das die Konjugate enthalten würde, aufgrund der geringen Konzentrationen ergeben. Die Membranfiltration schließlich schied aus, weil an den Membranen Adsorptionen auftreten können. Vom Hersteller der verwendeten Membranen wird angegeben, daß bei Serumproteinen Adsorptionsverluste von 2 bis $3 \cdot 10^{-4}$ g Protein pro cm^2 Membranfläche entstehen können. Bei einem Durchmesser der Membranen von 46 mm können die Eiweißverluste danach bis zu 5 mg pro Membran ausmachen.

Um dennoch untersuchen zu können, wie sich ein und dieselbe Probe bei wiederholtem Umsatz mit Substrat verhält, wurde auf ihre Isolierung verzichtet und die Aktivität in einer Ultrafiltrationszelle titrimetrisch bestimmt. Die Bedingungen der Messung waren die gleichen wie in Kapitel 2.2.1.4.2 beschrieben. Nach jeder Messung wurden die Lösungen mit Stickstoffüberdruck durch eine Membran filtriert. Im Anschluß daran wurde die Zelle mit neuer Substrat- und Pufferlösung gefüllt.

Es wurden Membranen mit verschiedenen Ausschlußgrenzen verwendet. Die Messungen wurden zehnmal durchgeführt. Im Anschluß daran wurden die Aktivitäten der überstehenden Lösung und der Membran getrennt bestimmt. Es waren zum Teil beträchtliche Konjugat- bzw. Enzymmengen an den Membranen

adsorbiert. Dies führte auch zur Stabilisierung des Enzyms, indem z.B. die Trypsinmoleküle voneinander getrennt werden und die Autolyse nicht mehr möglich war.

Dem Trypsin gegenübergestellt wurde das Konjugat PT 19. Letzteres wurde in Filtrationszellen mit Membranen der Ausschlußgrenzen (molecular weight cut off, MWCO) 10^5 D und $3 \cdot 10^5$ D eingesetzt, während Trypsin mit einer 10^4 D- und einer $5 \cdot 10^4$ D-Membran untersucht wurde. (Abb. 18)

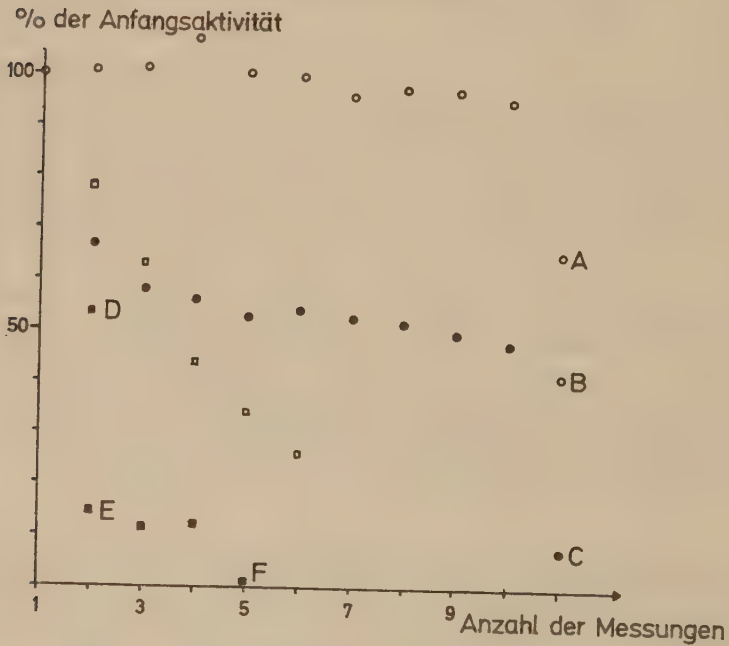


Abb. 18: Verhalten von PT 19 und Trypsin in einer Ultrafiltrationszelle bei mehrfacher Aktivitätsbestimmung (o PT 19, Membran-MWCO 100000 D; ● PT 19, Membran-MWCO 300000 D; □ Trypsin, Membran-MWCO 10000 D; ■ Trypsin, Membran-MWCO 50000 D).

Die Aktivität von PT 19 war im Membranreaktor mit dem MWCO 10^5 D stabil, bei der zehnten Messung waren noch immer 95 % des Anfangswertes vorhanden. Die elfte Messung zeigte, daß ca. 60 % dieser Aktivität in Lösung (A in Abb. 18) und ca. 40 % an der Membran adsorbiert (B in Abb. 18) vorlagen. Die relativ konstante Aktivität zeigte, daß die Molmasse von PT 19 zum ganz überwiegenden Teil größer als 100000 D war.

Der Reaktor mit dem MWCO 300000 D zeigte einen starken Aktivitätsabfall nach den ersten beiden Messungen. Angesichts der Lagerstabilität von PT 19 muß angenommen werden, daß während der ersten Filtrationen größere Mengen Konjugat die Membran passiert haben. Im weiteren Verlauf der Messungen sank die Aktivität nur noch langsam aber stetig ab, d.h. kleine Mengen Konjugat verließen die Filtrationszelle durch die Membran. Entsprechend den Angaben des Herstellers der Membranen läßt dies auf eine molare Masse der Hauptmenge von PT 19 schließen, das nur wenig kleiner als das MWCO, also etwas kleiner als 300000 D ist (Abb. 5). Der größte Teil der im Reaktor verbliebenen Aktivität war bei der elften Messung an der Membran adsorbiert, in der Lösung fanden sich nur 7,2 % der Anfangsaktivität (C in Abb. 18) bzw. 15,1 % der Aktivität der vorhergehenden Messung.

Trypsin wurde unter Verwendung einer Membran des MWCO 50000 D beim gleichen Vorgehen eingesetzt. Schon nach der ersten Filtration fanden sich 53 % der Aktivität im Filtrat (D in Abb. 18) und nur 15 % in der Ultrafiltrationszelle (E in Abb. 18). Der an 100 % fehlende Anteil muß während der Filtration zerstört worden sein. Die in der Filtrationszelle verbliebene Aktivität fiel nur noch langsam ab. Die Aktivität der Meßzelle betrug bei der 4. Messung 12 % der Anfangsaktivität. Die Lösung in der Meßzelle enthielt hier nur 1,2 % des Anfangswertes (F in Abb. 18), der Rest war an der Filtrationsmembran adsorbiert. Die Membran mit dem MWCO 10000 D hatte so kleine Poren, daß das Trypsin nicht ausfiltriert werden konnte. Daher war hier der Aktivitätsverlust auf die Autolyse zurückzuführen. Die Verluste betrugen jedes Mal 25 % des vorhergehenden Wertes. Bei konstanter Abnahme der Aktivität wären bei der 6. Messung 24 % Restaktivität zu erwarten gewesen, gefunden wurden 26 %.

Neben dem Einsatz in einem Batchreaktor wurde auch die Verwendbarkeit von PT 19 bzw. Trypsin in einem Durchflußreaktor untersucht. Dazu wurde ein Druckgefäß mit einem Vorrat an gepufferter Substratlösung zwischen eine Gasflasche, die den für die Filtration nötigen Überdruck lieferte, und die gerührte Ultrafiltrationszelle gesetzt. Das Filtrat durchlief eine Durchflußküvette in einem Photometer. Die Extinktion des Filtrates wurde kontinuierlich gemessen. PT 19 wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. In einem Fall war die Einwaage ähnlich groß wie die des in gleicher Weise untersuchten Trypsins, um vergleichbare Adsorptionsverhältnisse auf der Membran zu erhalten. Zudem bestand die Gefahr, daß sich bei der Ultrafiltration größerer Polymermengen eine Konzentrationspolarisation an der Membranoberfläche aufbaute, die die Durchflußeigenschaften der Membran verändern könnte. Dies sollte verhindert werden. Im anderen Fall wurde eine solche Menge PT 19 eingesetzt, daß deren Aktivität derjenigen des in gleicher Weise untersuchten Trypsins entsprach. Die verwendete Membran hatte in allen Fällen ein MWCO von 100000 D (Durchmesser 46 mm), die Konzentration des Substrates BAEE betrug 2,5 mMol/L. Es wurde bei pH 8 und 22°C gearbeitet. Die Durchflußmenge der Substratlösung wurde über den Gasüberdruck für die Filtration geregelt und auf 80-100 mL/h gehalten. Beim nativen Trypsin stieg die Extinktion des Filtrates zu Beginn der Messung schnell an, da das Produkt, das zunehmend gebildet wurde, eine höhere Absorption als das Substrat zeigte. Die Extinktion verharrte einige Zeit an ihrem maximalen Wert, der einem vollständigen Umsatz entsprach, und nahm dann allmählich ab (Abb. 19). Die Einwaage betrug 0,291 mg Trypsin, was einer Aktivität von 13,4 U entsprach. Die Abnahme der Extinktion zeigte einen verminderten enzymatischen Umsatz an. Während das Trypsin in der ersten Stunde noch im Überschuß vorhanden war und noch alles Substrat umsetzen konnte, wurde das Enzym im Laufe des Reaktorbetriebes durch die für seine molare Masse zu großen Membranporen ausgespült. Die Extinktion, und damit der Umsatz, strebten einem Endwert zu, der der Aktivität der an der Membran adsorbierten Trypsinmenge entsprach. Eine solche Adsorption ist auch bei dem Betrieb eines Batchreaktors festgestellt worden. Sie kann zu einer gewissen Stabilisierung von Enzymen führen. In dem hier eingesetzten Membranreaktor war der stabilisierende Einfluß der Adsorption des Trypsins an die Membran aber so gering, daß der Umsatz im Reaktor schnell nachließ.

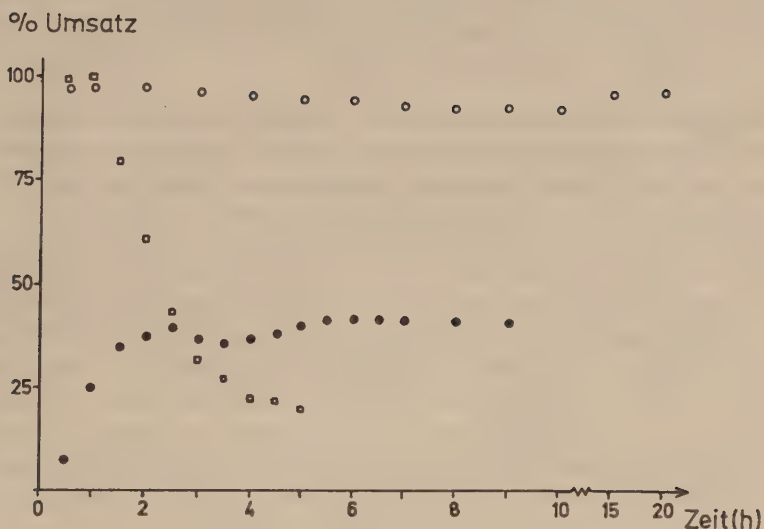


Abb. 19: Umsetzung von BAEE in einem Durchflußreaktor mit PT 19 bzw. Trypsin, Membran MWCO 100000 D, o PT 19, Einwaage 13,9 U; ● PT 19, Einwaage 2,5 U; □ Trypsin, Einwaage 13,4 U

PT 19 wurde, wie schon erwähnt, in zwei Konzentrationen eingesetzt. Der Enzymreaktor mit der kleineren Menge Konjugat (Einwaage 0,375 mg, entsprechend 2,5 U) benötigte ungefähr zwei Stunden, um einen 35 %igen Umsatz zu erreichen. Dann erst hat sich ein Gleichgewicht zwischen Umsatzgeschwindigkeit des gebundenen Enzyms, Substratzufluß und Produktabfluß eingestellt. Der Umsatz bewegte sich in der Folgezeit zwischen 35 und 40 %, je nach Durchflußgeschwindigkeit. Nach 9 Stunden Betrieb wurde der Versuch abgebrochen.

Im Falle der größeren PT 19-Menge (Einwaage 2,080 mg, entsprechend 13,9 U) wurde der Reaktor während 24 Stunden betrieben. Die Extinktion stieg schnell auf ihren Maximalwert und blieb unter leichten Schwankungen dort. Der Umsatzgrad betrug 94-99 %. Zur Kontrolle, ob die Umsetzung im Reaktor, wie berechnet, wirklich vollständig ist, wurde der Durchfluß für einige Zeit

unterbrochen. In Fällen, in denen die Reaktion im Reaktor nicht vollständig abläuft, sollte ein Extinktionsanstieg zu beobachten sein, wenn das Substrat mit dem Enzym eine längere Zeit reagieren kann. Ein solcher Extinktionsanstieg ist nicht beobachtet worden.

Die beschriebenen Beispiele zeigen die Vorteile der kovalenten Bindung von Trypsin an wasserlösliche Polymere. Das beträchtlich höhere Molekulargewicht der Konjugate, verglichen mit dem nativen Trypsin, erlaubte die Verwendung von Ultrafiltrationsmembranen mit größeren Poren.

Wie das Beispiel des nativen Trypsins in dem Batchreaktor mit einer Membran des MWCO 10000 D zeigte, ist die Stabilität des Enzyms in einem Reaktor von wesentlicher Bedeutung. Die Poren der eingesetzten Membran waren zwar klein genug, um das Enzym zurückzuhalten, dieses wurde jedoch durch Autolyse denaturiert. Das Konjugat PT 19 besaß sowohl eine deutlich höhere molare Masse als das native Trypsin, wie auch eine wesentlich größere Beständigkeit gegen denaturierende Einflüsse. Es zeigte sich damit beim Einsatz in einem Membranreaktor dem freien Enzym deutlich überlegen.

2.2.1.4.7 Bestimmung der Molmassen von (Träger l/Trypsin)-Konjugaten mit Hilfe der Ultrazentrifuge

Die ursprünglich von T. Svedberg (87) zur Untersuchung von Kolloiden entwickelte Ultrazentrifuge hat sich viele Anwendungsgebiete erobert. Sie ist bisher eingesetzt worden u.a. zur Bestimmung von Molmassen und Molmassenverteilungen, von Reibungskoeffizienten, zur Bestimmung des Solvatationsgrades gelöster Substanzen, der Viskosität von Lösungen und von Diffusionskoeffizienten sowie zur Stofftrennung aufgrund unterschiedlicher Auftriebsdichten. Alle Anwendungen beruhen auf der Erkenntnis, daß die Bewegung eines Teilchens in einem Zentrifugalfeld durch das angelegte Schwerfeld, den Reibungswiderstand und das chemische Potential bestimmt wird. Die heute gebräuchlichen analytischen Ultrazentrifugen erreichen bei ca. 70000 Umdrehungen pro Minute eine Beschleunigung von ungefähr 350000 g. Die Rotoren besitzen 2 bis 6 Bohrungen für die Meßzellen. Die Rotorkammer ist evakuierbar, damit sich die Rotoren während des Laufes nicht erhitzen.

In dieser Arbeit wurde die Ultrazentrifuge zur Bestimmung der molaren Masse von (Träger 1/Trypsin)-Konjugaten eingesetzt. Dabei gibt es die Möglichkeiten der Gleichgewichtszentrifugation und der Verfolgung der Sedimentationsgeschwindigkeit. Das zweite Verfahren ist hier angewendet worden.

Genau genommen ist der Ausdruck molare Masse aber nur bei einheitlichen Molekülen anwendbar. In den anderen Fällen treten an seine Stelle verschiedene Molmassenmittelwerte. Sie unterscheiden sich durch die Art des statistischen Gewichts, mit der die einzelnen Molekülsorten gemessen werden. Die wichtigsten Mittelwerte der Molmassen ergeben sich durch die folgenden Definitionen:

$$\text{Zahlenmittel: } \bar{M}_n = \frac{\sum_i n_i M_i}{\sum_i n_i}$$

$$\text{Massenmittel: } \bar{M}_w = \frac{\sum_i w_i M_i}{\sum_i w_i} = \frac{\sum_i n_i M_i^2}{\sum_i n_i M_i}$$

(w: Massenbruch)

(n: Molzahl)

(M: Molmasse)

Neben diesen einheitlichen Mittelwerten existiert noch eine Reihe gemischter Mittelwerte, die immer dann auftreten, wenn die zu bestimmende molare Masse aus Größen gewonnen wird, die nicht nur allein von der Molmasse abhängen (z.B. Viskosität), oder wenn zur Gewinnung der Molmasse zwei Größen kombiniert werden. Das ist z.B. der Fall bei der hier durchgeführten Berechnung von Molmassen über die Messung von Sedimentationsgeschwindigkeit und Diffusion. Die so erhaltene Molmasse $\bar{M}_{sd}$ kann in guter Näherung als Massenmittel $\bar{M}_w$ betrachtet werden (130).

Die Ultrazentrifuge wurde eingesetzt, um die molaren Massen der (Träger 1/ Trypsin)-Konjugate PT 8, PT 10, PT 11, PT 12, PT 16, PT 18 und PT 19 zu bestimmen. Es sollte untersucht werden, ob und in welcher Weise das Verhältnis der Reaktionspartner, Reaktionsdauer und pH-Wert Einfluß auf die Molmasse der Konjugate nehmen. Die ersten drei Konjugate der Reihe unterschieden sich in ihrem Enzymgehalt, entsprechend den unterschiedlichen Mengenverhältnissen der Komponenten im Reaktionsansatz. PT 18 entsprach im Verhältnis der Mengen der Reaktionspartner dem Konjugat PT 12, die Umsetzungsdauer war aber kürzer. PT 16 schließlich unterschied sich von den übrigen durch den veränderten pH-Wert bei der Umsetzung. Vor der Messung in der Ultrazentrifuge wurden die Proben dialysiert und im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet. Außerdem wurde die enzymatische Aktivität

der Konjugate bestimmt, um zu prüfen, ob schon während der Dialyse Aktivitätsverluste aufgetreten sind. Aktivitätsverluste hätten ein Hinweis auf einen Abbau der Konjugatmoleküle sein können, z.B. durch Spaltung eines Trypsinmoleküls, das mehrere Polymerketten verbindet. Ebenso wurde bei einigen Proben die Aktivität nach den Untersuchungen in der Ultrazentrifuge bestimmt. Es waren weder nach der Dialyse noch nach dem Einsatz in der Zentrifuge Verluste an enzymatischer Aktivität feststellbar. Es kann also angenommen werden, daß die Konjugate während der Messungen stabil waren. Die nach dem Trocknen möglichst schnell abgewogenen hygroskopischen Substanzen wurden in Standardacetatpuffer mit dem pH 4,62 gelöst. Unter diesen Bedingungen ist Trypsin auch bei Raumtemperatur ausreichend stabil und das Konjugat gut löslich. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10

Resultate der Untersuchung von (Träger 1/Trypsin)-Konjugaten mit Hilfe der Ultrazentrifuge

Konjugat	Massenverhältnis Träger/Kuppler/ Enzym im Ansatz	Kupplungs- bedingungen pH	Zeit(h)	s_{13} ($\cdot 10^{-13}$) (sec^{-1})	D_7 ($\cdot 10^{-7}$) (cm^2/sec)	part. spez. Vol ₃ (cm^3/g)	Mol- masse (g/mol)
PT 8	10/4/2	6	46	3,21	6,93	-	45500
PT 10	10/4/1	6	49	1,79	4,16	0,718	42500
PT 10	(nach Reinigung an SephadexG-100)		2,40		3,38	0,749	70800
PT 11	10/4/2	6	49	1,81	3,85	0,759	49000
PT 12	10/4/4	6	48	2,88	2,90	0,754	98700
PT 16	10/4/2	3	20	2,01	3,40	0,771	55100
PT 18	10/4/4	6	20	3,25	2,74	0,742	117600
PT 19	10/4/4,5	6	42	4,60	4,39	0,750	104100

s : Sedimentationskoeffizient

D : Diffusionskoeffizient

Den Messungen zufolge hängt die molare Masse der Konjugate im wesentlichen von der eingesetzten Trypsinmenge ab. Die zum Teil sehr geringen Molmassen waren ein Hinweis auf sehr uneinheitliche Produkte. Die erwarteten Werte für die molaren Massen lagen wesentlich höher. So wurde für PT 10 ein Wert von mindestens ca. 250000 D erwartet, da dieses Konjugat

einen Eiweißgehalt von etwas weniger als 10 Gew.% zeigte. Unter der Annahme, daß diese Menge einem Trypsinmolekül mit der Molmasse 23500 D entspricht, wurde der oben genannte Wert errechnet. Zur weiteren Untersuchung wurde daher zusätzlich zum durchgeführten Sedimentationsgeschwindigkeitslauf der Ultrazentrifuge ein Gleichgewichtslauf mit dem Konjugat PT 10 durchgeführt, um Aussagen zu erhalten, die Rückschlüsse auf die Einheitlichkeit oder Uneinheitlichkeit der Probe zulassen. Aus den bei dem Gleichgewichtslauf erhaltenen schlierenoptischen Aufnahmen ergab sich bei der Auswertung eine Kurve, in der in erster Näherung zwei Grenz-Geraden erkennbar waren (Abb. 27, Kapitel 3.3.11). Aus der Steigung jeder dieser Geraden wurde eine molare Masse berechnet. Es wurden Molmassen zwischen 29600 D und 64400 D gefunden. Um die Anteile von PT 10 mit kleinen molaren Massen abzutrennen, wurde eine Probe an Sephadex G-100 gereinigt. Im Ausschlußvolumen erschien ein Peak, das zugehörige Eluat wurde durch eine Membranfiltration entsalzt. Von der eingesetzten Substanz war nur ungefähr die Hälfte in der ersten Fraktion enthalten. Eine erneute Bestimmung der Molmasse von PT 10 ergab jetzt 70800 D. Eine Wiederholung der Bestimmung des Eiweißgehaltes ergab 14,2 Gew.% Eiweiß, die Aktivität stieg ebenfalls an (s. Tabelle 11), diese blieb aber hinter der Erhöhung des Eiweißgehaltes zurück, so daß eine verminderte relative Aktivität berechnet wurde.

Tabelle 11

Vergleich der Eigenschaften des Konjugates PT 10 vor und nach einer Reinigung an Sephadex G-100

	$s \cdot 10^{13}$ (sec^{-1})	$D \cdot 10^7$ (cm^2/sec)	Molmasse g/mol	Gew.% Enzym	Aktivität U/mg Konj.	relative Aktivität
vor Reinigung	1,79	4,16	42500	8,6	1,3	51,2 %
nach Reinigung	2,40	3,38	70800	14,2	1,8	43,0 %

Aus der Erhöhung des Eiweißgehaltes von PT 10 kann geschlossen werden, daß durch die Gelchromatographie im wesentlichen Moleküle des Trägers 1 abgetrennt worden sind. Ebenso kann für die anderen trypsinhaltigen Konjugate angenommen werden, daß sie noch Träger 1 enthalten, so daß ihre wahren molaren Massen deutlich größer sind als mit der Ultrazentrifuge bestimmt worden ist. Auch die Abschätzung für die Molmasse des Konjugates PT 19,

die anhand der Ergebnisse der Messungen in den Membranreaktoren gemacht worden ist (Kapitel 2.2.1.4.5), wird bestätigt. Dort war für den im Reaktor verbliebenen aktiven Anteil des Konjugates eine molare Masse von deutlich über 100000 D angenommen worden, in einem Bereich, in dem die Membranen mit der Ausschlußgrenze 300000 D schon eine beträchtliche Retention bewirkten, also um 250000 D. Aus den mit Hilfe der Ultrazentrifuge erhaltenen Molmassen lassen sich Aussagen über die Anzahl der am Aufbau der Konjugate beteiligten Trypsin- und Polymermoleküle nur für PT 18 und PT 19 machen (Tabelle 10). Mit einem Eiweißgehalt von ca. 40 Gew.% und molaren Massen von 100000 - 120000 D läßt sich für ein "mittleres" Molekül angeben, daß je 2 Trypsinmoleküle mit 5-6 Polymermolekülen verknüpft sind. Das Verfahren, nach dem die Konjugate PT 1 - PT 29 dargestellt worden sind, war zwar einfach und schnell, es lieferte aber sehr uneinheitliche Konjugate, die vermutlich nicht umgesetztes Polymer enthielten.

In Tabelle 12 sind die molaren Massen von einigen Polymeren und weitere Daten, die der Berechnung ihrer Massen dienten, zusammengefaßt. Bei den voneinander abgeleiteten Polymeren sind die partiellen spezifischen Volumina jeweils nur einmal bestimmt worden. Dieser Wert wurde für das zweite Polymer übernommen. Da auch der Unterschied der partiellen spezifischen Volumina von Träger 1 und Polymer 4-Acetat sehr gering ist, erschien dieses Vorgehen zulässig.

Tabelle 12

Ergebnisse der Bestimmung der Molmassen von einigen Polymeren in der Ultrazentrifuge

Träger bzw. Polymer	Sedimentations- koeffizient s (1/sec)	Diffusions- koeffizient D (cm ² /sec)	partielles spez. Vol. (cm ³ /g)	molare Masse (g/mol)
1	1,125 · 10 ⁻¹³	9,12 · 10 ⁻⁷	0,753	12700
2b	0,86 · 10 ⁻¹³	7,36 · 10 ⁻⁷	-	11700 a)
4-Acetat	1,08 · 10 ⁻¹³	0,67 · 10 ⁻⁷	0,755	131400
4	1,76 · 10 ⁻¹³	1,49 · 10 ⁻⁷	-	120200 b)

a) mit dem part. spez. Vol. von Träger 1

b) mit dem part. spez. Vol. von Träger 4-Acetat

Auch die molare Masse einer der verwendeten Trypsinchargen wurde in der Ultrazentrifuge bestimmt. Dazu wurde eine Lösung des Enzyms in 1 mmol HCl eingesetzt, um die Autolyse zu verhindern. Mit einem Sedimentationsgeschwindigkeits- und Diffusionslauf wurden aufgrund von Verunreinigungen des Enzyms nur sehr kleine Molmassen gefunden (11500 g/mol). Ein Sedimentations-Diffusions-Gleichgewichtslauf erbrachte deutlich höhere Massen, insbesondere bei der Auswertung der steileren Kurvenabschnitte (bis zu 18100 g/mol anstatt ca. 23500 g/mol für Trypsin).

2.2.1.5 Umsetzung von Trypsin mit Carbodiimid

Unter den Bedingungen der Kupplung von Trypsin an Träger 1 wurde auch versucht, Trypsin zu vernetzen. Eine solche kovalente Polymerisation ist als Nebenreaktion der Umsetzung von Proteinen in Gegenwart von CDI von R. Timkovich beschrieben worden (88).

Trypsin wurde bei pH 6 und 4°C zwei Tage mit CDI umgesetzt, anschließend wurde mit Ammoniumsulfat gefällt. Während das polymergebundene Enzym einen klebrigen Niederschlag ergab, von dem die überstehende Lösung abgegossen werden konnte, mußte das fein verteilte eventuell vernetzte Trypsin abzentrifuiert werden. Das Sediment wurde einer Membranfiltration unterworfen. Die Ausschlußgrenze der Membran lag bei 100000 D, um "monomeres" Trypsin zumindest teilweise abtrennen zu können. Die Ausbeute betrug 16 % der Einwaage an Enzym.

Die Anfangsaktivität der isolierten Substanz betrug 30,9 U/mg, sie nahm bei Lagerung des Produktes in wäßriger Lösung bei 18°C innerhalb der ersten 50 Minuten um 30 % ab. Dabei lag die gemessene Anfangsaktivität auch schon um 30 % unter der Aktivität des nativen Enzyms. Die beobachteten Effekte der deutlichen Stabilisierung der Konjugate aus Träger 1 und Trypsin gegenüber desaktivierenden Einflüssen und das verbesserte Verhalten der Konjugate in Membranfiltrationszellen, verglichen mit dem freien Trypsin, wurden also unter den angewendeten Bedingungen nicht durch die Vernetzung einzelner Trypsinmoleküle herbeigeführt.

2.2.2 Konjugate aus Träger 2a und Trypsin (PT 30 - PT 33)

2.2.2.1 Herstellung und Isolierung der (Träger 2a/Trypsin)-Konjugate

Neben der Kupplung von Enzymen an Carboxylgruppenhaltige Polymere in Gegenwart von Kupplungsreagenzien ist es auch - wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben - möglich, Carboxylgruppen als aktivierte Ester zur Reaktion zu bringen. Die Aminolyse der Estergruppierung verläuft schnell und unter schonenden Bedingungen. Die Kinetik der Aminolyse ist mit einem niedermolekularen Amin von A. Pollak et al. (89) untersucht worden. Diese Autoren haben N-Acryloylsuccinimid und Acrylamid zu einem löslichen Polymeren umgesetzt und dieses in Gegenwart eines Vernetzers und von Enzym zu verschiedenen Gelen umgesetzt (90). In Anlehnung an die dort beschriebenen Bedingungen der Reaktion des Polymeren mit Enzym wurde Träger 2a mit Trypsin bei pH 7,5 umgesetzt. Den Produkten mit einer Reaktionszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur wurde ein Konjugat gegenübergestellt, das 20 Stunden bei 4°C reagiert hatte.

Die Isolierung der Konjugate geschah in einem Fall durch eine Fällung des Konjugates durch mäßiges Ansäuern der Reaktionslösung und durch Abzentrifugieren. Zu starkes Ansäuern führte zum Wiederauflösen des Niederschlages. Die übrigen Konjugate wurden von überschüssigem Polymer und Enzym mittels Gelchromatographie an Sephadex G-100 gereinigt.

Die Gelchromatographie, auch Gelfiltration oder Ausschlußchromatographie genannt, ist eine Methode zur Trennung von Molekülen nach ihrer Größe und Gestalt. Die Trennung verschiedener Moleküle kommt dadurch zustande, daß kleinere Moleküle in das Innere von Gelpartikeln aus dreidimensional vernetzten Makromolekülen eindringen können, während große Teilchen keinen Zugang haben. Die Porengröße, und damit auch die Größe der Moleküle, die nicht mehr in die Gelpartikel eindringen können, hängt vom Vernetzungsgrad des Geles ab. Sofern keine Wechselwirkungen mit dem Gel auftreten, werden größere Moleküle vor kleineren eluiert. Diejenigen Moleküle, die in keine der Poren der Gelpartikel eindringen können, die demnach größer als die Ausschlußgrenze des Geles sind, werden eluiert, nachdem dasjenige Lösungsmittelvolumen durch die Säule geflossen ist, das sich zwischen den Gelteilchen befindet. Dieses Volumen ist das sogenannte

Ausschlußvolumen. Kleine Moleküle können in alle Poren eindringen, sie werden, falls sie nicht mit dem Gel in Wechselwirkung treten, eluiert, nachdem so viel Elutionsmittel die Säule durchlaufen hat, wie dem Säulenvolumen abzüglich dem Volumen der Gelmatrix entspricht.

Zur Unterdrückung der Autolyse von Trypsin wäre es vorteilhaft gewesen, die Chromatographie mit einem sauren Elutionspuffer vorzunehmen. Wegen der schlechten Löslichkeit der Konjugate bei niedrigen pH-Werten wurde ein neutraler Phosphatpuffer verwendet. Im Eluat wurde photometrisch kein freies Trypsin gefunden. Der einzige Peak erschien im Ausschlußvolumen. Die Konjugate wurden im Anschluß an die Chromatographie, wie schon in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben, durch eine Membranfiltration des Eluates entsalzt und anschließend gefriergetrocknet. Die Ausbeuten können Tabelle 13 entnommen werden. Die saure Fällung erbrachte nur eine geringe Ausbeute (PT 33). Die Verlängerung der Reaktionszeit führte zu einer Erhöhung der Ausbeute, wie der Vergleich der bei PT 31 und PT 32 erhaltenen Werte zeigt.

Tabelle 13

Konjugate aus Träger 2a und Trypsin. Bedingungen der Reaktion und der Reinigung

	PT 30	PT 31	PT 32	PT 33
Mengenverhältnis Polymer/Trypsin	10/4	10/8	10/8	10/4
Umsetzungsdauer (Stunden)	1	1	20	1
Umsetzungs-pH	7,5	7,5	7,5	7,5
Methode der Isolierung	Gelchromatographie			Fällung
Ausbeute ^{a)}	38 %	40 %	50 %	22 %

a) Die Summe aus Polymer- und Enzymeinwaage bei der Reaktion entspricht 100 %.

2.2.2.2 Eigenschaften der (Träger 2a/Trypsin)-Konjugate

Der Eiweißgehalt der Konjugate PT 30 - PT 33 wurde wie in 2.2.1.4.1. beschrieben, photometrisch mit Hilfe der zweiten Ableitung des Spektrums im Bereich 320 - 260 nm bestimmt. Dabei wurde ein Enzymgehalt gefunden, der dem Anteil des Enzyms im Reaktionsansatz entsprach. Eine Ausnahme bildete PT 33 mit nur 4,2 Gew.% Enzym. Die Fällung dieses Konjugates durch das Ansäuern seiner Lösung führte offenbar im wesentlichen zur Fällung des polymeren Trägers. Die Verlängerung der Reaktionszeit führte zu einer geringfügigen Erhöhung des Eiweißgehaltes bei PT 32 gegenüber PT 31 (s. Tabelle 14).

Tabelle 14

Aktivität und Eiweißgehalt der (Träger 2a/Trypsin)-Konjugate und Vergleich mit (Träger 1/Trypsin)-Konjugaten

Konjugat	Eiweißgehalt Gew.%	Aktivität U/mg Konjugat	relative Aktivität (%)
PT 30	25,7	3,9	51
PT 31	44,2	5,6	43
PT 32	47,4	6,9	49
PT 33	4,2	2,0	159
PT 20	34,0	6,9	45
PT 21	49,2	12,2	54

(Mengenverhältnis Polymer/Trypsin im Reaktionsansatz bei PT 20 : 10/4 wie PT 30, bei PT 21 : 10/8 wie PT 31 und PT 32)

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität wurde auch hier photometrisch mit BAEE als Substrat durchgeführt. Auffällig ist der deutliche Anstieg der Aktivität bei PT 32 nach längerer Reaktionszeit als bei PT 31. Bei einem nur geringfügig erhöhten Eiweißgehalt führte dieser Anstieg zu einer beträchtlichen Erhöhung der relativen Aktivität. Der Vergleich von PT 30 und PT 31 zeigt auch hier, daß ein höherer Eiweißgehalt im Konjugat zu einer verminderten relativen Aktivität führt. Die, verglichen mit dem sehr geringen Eiweißgehalt, hohe Aktivität von PT 33 führte zu einer relativen Aktivität von 159 %. Mit dieser einen Ausnahme liegen die relativen Aktivitäten der Konjugate mit Träger 2b in den gleichen Bereichen wie bei den bisher beschriebenen trypsinhaltigen Konjugaten.

Die Lagerstabilität der Konjugate PT 30 - PT 32 wurde in Lösung bei pH 8,5 und bei Raumtemperatur untersucht (s. Tabelle 15). Die verbleibende Aktivität wurde über zwei Wochen verfolgt. Dabei zeigten die Konjugate eine beträchtliche Stabilität. Die Verluste an enzymatischer Aktivität betrugen nach einer Woche etwas über 20 %, und nach zwei Wochen Lagerung waren noch 2/3 der Anfangsaktivität erhalten. Diese Stabilität übertrifft beträchtlich diejenige des Konjugates PT 21, bei dem das gleiche Mengenverhältnis

Tabelle 15

Lagerstabilität der (Träger 2a/Trypsin)-Konjugate und Vergleich mit (Träger 1/Trypsin)-Konjugaten bei pH 8,5 und Raumtemperatur

Konjugat	% der Anfangsaktivität nach	
	7 Tagen	14 Tagen
PT 30	79	67
PT 31	78	67
PT 32	79	-
PT 20	42 a)	-
PT 21	51 b)	-

a) nach 6 Tagen, b) nach 4 Tagen

von Polymer zu Enzym eingesetzt worden ist wie bei PT 31 und PT 32. Ebenso ist das Verhältnis bei dem Vergleich von PT 30 mit PT 20. PT 21 zeigte nach nur vier Tagen nur noch ca. 50 % der Anfangsaktivität und PT 20 zeigte nach sechs Tagen nur noch 42 % der Anfangsaktivität. Auch die in Abb. 11 aufgeführten Konjugate waren weniger stabil. Nur PT 19 zeigte eine bessere Lagerstabilität (Abb. 12, Kapitel 2.2.1.4.4). Die verlängerte Reaktionszeit von PT 32 hatte keinen Einfluß auf die Lagerstabilität unter den beschriebenen Bedingungen. Für PT 32 konnte die Restaktivität nach zwei Wochen Lagerung wegen Pilzbefalls der Lösung nicht mehr bestimmt werden, es ist aber anzunehmen, daß es sich wie die beiden anderen Konjugate verhält.

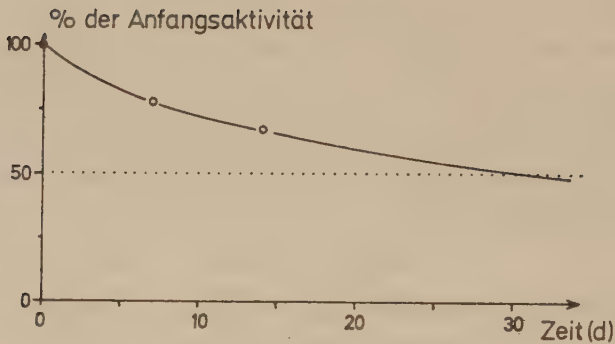


Abb. 20: Bestimmung der Halbwertszeit der Konjugate PT 30 und PT 31 durch Extrapolation der bei der Untersuchung der Lagerstabilität erhaltenen Werte

Zur Bestimmung der Halbwertszeit der Konjugate PT 30 und PT 31 wurde eine Extrapolation der Angaben aus Tabelle 15 vorgenommen (Abb. 20). Danach ist die enzymatische Aktivität dieser Konjugate erst nach ungefähr einem Monat auf die Hälfte abgefallen. Sie zeigten damit eine beträchtliche Stabilität. Eine genauere Bestimmung war nicht möglich, da auch diese Proben nach einiger Zeit einen Pilzbefall zeigten.

2.2.3 Konjugate aus Träger 2b und Trypsin (PT 34 - PT 37)

Zur Darstellung der Konjugate aus Träger 2b und Trypsin wurde ähnlich wie bei Träger 1 verfahren. Bei einem schwach sauren pH-Wert wurde mit einem wasserlöslichen Carbodiimid zwei Tage umgesetzt. Die Kupplungsprodukte wurden an Sephadex G-100 gereinigt. Dabei wurde ein schwach saurer Elutionspuffer eingesetzt, um die Autolyse des Trypsins zu unterdrücken. Da die Konjugate PT 34 und PT 35 nach der Ultrafiltration zur Entsalzung und nach der Gefriertrocknung nur noch teilweise in Wasser löslich waren, wurden die Konjugate PT 36 und PT 37 im Elutionspuffer aufbewahrt und eingefroren. Dennoch waren Teile dieser Konjugate nach dem Wiederauftauen unlöslich. Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität und des Eiweißgehaltes wurden wie schon beschrieben durchgeführt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen an den (Träger 2b/Trypsin)-Konjugaten sind in Tabelle 16 zusammengefaßt.

Tabelle 16

Zusammensetzung und Eigenschaften der (Träger 2b/Trypsin)-Konjugate

Konjugat	Massenverhältnis im Ansatz Polymer/CDI/ Enzym	Kupplungs- pH	-dauer (d)	Eiweiß- gehalt (%)	Aktivität U/mg	rel. Akti- vität (%)
PT 34	50/14/20	5,5	2	12	1,6	44
PT 35	50/14/20	5,6	2	-	2,3	-
PT 36	50/20/40	5,6	2	40	5,2	43
PT 37	50/40/40	5,6	2	43	4,4	34

Die enzymatischen Eigenschaften gleichen denen der entsprechenden Konjugate aus Träger 1 und Trypsin. Ein wesentlicher Unterschied zwischen beiden Reihen ist die schlechte Löslichkeit der Konjugate mit Träger 2b, die auf eine deutlich höhere molare Masse der Konjugate PT 34 - PT 37 schließen läßt, als sie bei den Konjugaten mit Träger 1 gefunden wurde. Die gleichzeitige Anwesenheit von Amino- und Carboxylgruppen in dem Polymeren begünstigt offenbar Vernetzungsreaktionen bei der Kupplungsreaktion mit dem Enzym.

2.2.4 Trypsinhaltige Konjugate aus den Trägern 6a - 6c und Trypsin (PT 38 - PT 46)

Die Träger 6a - 6c enthielten Acrylsäurehydrazid-Einheiten als reaktive Gruppen. Trotz der schlechten Löslichkeit dieser Träger wurde versucht, Trypsin kovalent an die freien Aminogruppen der Hydrazide zu binden. Die Kupplung wurde, wie schon beschrieben, mit N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-äthyl-carbodiimid bei einem schwach sauren pH-Wert durchgeführt. Im Gegensatz zu der Reaktion des Trypsins mit dem carboxylgruppenhaltigen Träger 1, bei der freie Aminogruppen des Enzyms reagierten, mußten hier freie Carboxylgruppen des Enzyms mit den polymergebundenen Aminogruppen reagieren. Die Konjugate wurden nach einem Tag Reaktionszeit mit Ammoniumsulfat ausgefällt. Die Entsalzung der Konjugate wurde mittels einer Ultrafiltration durchgeführt. Hierbei bildeten die Konjugate auf der Filtrationsmembran Gelschichten, die sich nur schlecht bzw. zum Teil gar nicht mehr

in Wasser lösten. Die unlöslichen Anteile der Produkte wurden verworfen. Ihre Lösungen wurden lyophilisiert. Zur Untersuchung auf die Abwesenheit nicht kovalent gebundenen Trypsins wurde bei einer Auswahl der Konjugate die Methode der Elektrofokussierung angewandt. Diese war als Analysemethode dann notwendig, wenn die Konjugate durch eine Ausfällung gewonnen worden sind, da Mitfällungen von ungebundenem, nativem Enzym nicht ausgeschlossen werden konnten. Es zeigte sich, daß bei den Ansätzen, bei denen Trypsineinwaage höher als die des CDI lag, noch freies Enzym vorhanden war (Ergebnis der Elektrofokussierung positiv). Die übrigen Ansätze waren im wesentlichen frei von ungebundenem Enzym. Obwohl für die Ultrafiltration Membranen mit der Ausschlußgrenze 100000 D eingesetzt worden sind, war aufgrund der Bildung einer Gelschicht auf der Membran, die die Ausschlußgrenze drastisch senkte, eine Abtrennung des ungebundenen, überschüssigen Enzyms bei großen eingesetzten Trypsinmengen nicht mehr möglich.

Tabelle 17
Trypsinhaltige Konjugate der Träger 6a - 6c

Konjugat	Träger	Massenverhältnis Träger/CDI/Enzym			Ergebnis der Elektrofok.*	Aktivität U/mg Konj.
PT 38	6a	5	2	1	(pos)	0,32
PT 39	6a	5	2	2	-	0,34
PT 40	6a	5	2	4	pos	0,70
PT 41	6b	5	2	1	neg	0,03
PT 42	6b	5	2	2	neg	0,13
PT 43	6b	5	2	4	pos	0,37
PT 44	6c	5	2	1	-	0,08
PT 45	6c	5	2	2	neg	0,07
PT 46	6c	5	2	4	-	1,14

* neg: es wurde kein freies Enzym gefunden

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität wurde mit BAEE als Substrat optisch durchgeführt. Dabei lösten sich die Proben nur teilweise in Wasser, es müssen also bei der Gefriertrocknung Vernetzungen entstanden sein. Diejenigen Konjugate, die der Elektrofokussierung zufolge frei von nicht umgesetztem Trypsin waren, zeigten nur sehr geringe Aktivitäten.

Der Versuch der Bestimmung des Eiweißgehaltes der Konjugate mit Hilfe der Derivativspektroskopie scheiterte. Zwar konnten die Konjugate durch Kochen mit Salzsäure in Lösung gebracht werden, sie zeigten aber im Meßbereich von 320 nm bis 240 nm eine stetig ansteigende Absorption mit einer nur sehr schwach ausgebildeten Schulter bei 280 - 260 nm, die keine Auswertung der zweiten Ableitung des Spektrums zuließ. Die Bestimmung des Enzymgehaltes mittels der Folin-Methode (91) war hier nicht möglich, da auch die polymeren Träger positive Farbreaktionen lieferten. Aus den UV-Spektren kann allenfalls ersehen werden, daß der Eiweißgehalt niedrig ist. Vermutlich sind zu wenige Carboxylgruppen am Trypsin für das Polymer erreichbar, wohingegen z.B. alle 15 Lysingruppen des Enzyms zugänglich sind und modifiziert werden können, ohne daß das Enzym seine Aktivität verliert (92).

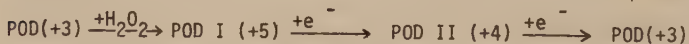
Die Hydrazidgruppen enthaltenden Träger 6a - c waren aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit zur Darstellung wasserlöslicher Enzym-Polymer-Konjugate ungeeignet. Zudem zeigte die geringe Aktivität der erhaltenen Immobilisate, daß die hier angewendete Kupplungsreaktion das Trypsin weitgehend inaktiviert hat.

2.2.5 Konjugate aus Träger 1 und Peroxidase (PP 1 - PP 10)

2.2.5.1 Peroxidase

Der Begriff Peroxidase umfaßt einige recht spezifische Enzyme, wie z.B. NAD-Peroxidase und Fettsäureperoxidase, und eine Gruppe recht unspezifischer Enzyme, die im Pflanzen- und Tierreich weit verbreitet sind. Diese werden unter der E.C.Nummer 1.11.1.7. zusammengefaßt. Zu diesen gehört auch die in dieser Arbeit eingesetzte Meerrettich-Peroxidase (POD). Ihnen gemeinsam ist die Beteiligung eines Porphyrinringsystems mit einem Eisenatom als Zentralatom an der katalytischen Reaktion. Die unspezifischen Peroxidasen zeigen nur gegenüber den Wasserstoffakzeptoren eine Spezifität. Als Akzeptoren kommen nur Substanzen mit der Gruppe -O-OH in Frage, wie H_2O_2 , Methyl- und Äthylhydroperoxid. Als Wasserstoffdonatoren kommen zahlreiche Substanzen in Frage, darunter sind Phenole, Amine und Leukofarbstoffe (93). Die Reaktion mit den Substraten verläuft über mehrere Zwischenstufen, die spektroskopisch beobachtet werden können. Im ersten

Schritt wird das Enzym durch den Wasserstoffakzeptor oxidiert, in zwei weiteren Stufen wird es durch Reaktion mit einem Wasserstoffdonator wieder reduziert:



Dabei geben die Zahlen in Klammern die Oxidationsstufe des Enzyms an, bezogen auf das natürliche Enzym mit der Stufe +3. Einen Überblick über diese und weitere Oxidationsstufen von POD geben I. Yamazaki und K. Yokota (94).

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte natürlich vorkommende POD aus Meerrettich ist nicht einheitlich. K.G. Paul und T. Stigbrand isolierten 4 Isoperoxidasen und charakterisierten diese durch ihre Zusammensetzung, ihre Spektren und ihre isoelektrischen Punkte (95). Die vollständige Aminosäuresequenz einer der PODs wurde erstmals von K.G. Welinder angegeben (96). Neben der Kette von 308 Aminosäuren und einer Hämingruppe enthält dieses Isoenzym acht neutrale Kohlenhydratseitenketten. Mit der Molmasse der Aminosäuresequenz von 33890 D und einem Kohlenhydratgehalt von 18 % erhält man als Molmasse des gesamten Enzyms ungefähr 42000 D.

Die Reinheit eines POD-Präparates wird durch die Reinheitszahl (RZ) angegeben. Diese ist der Quotient aus den Extinktionswerten der Wellenlängen 402,5 nm und 280 nm. Die RZ liegt in der Literatur bei den verschiedenen gereinigten Präparaten zwischen 3 und 4 (95). Die Werte nehmen mit steigender Reinheit zu. Für die verwendete POD-Charge wurde eine RZ von 1,26 ermittelt ($c = 14,5 \mu\text{Mol/L}$).

Anwendungen der POD sind in einer Reihe von Arbeiten beschrieben worden. So wurden Amine mit POD und H_2O_2 zu Iminen oxidiert (97). G.J. Bartling setzte 2,4,6-Trimethylanilin um und konnte durch Hydrolyse des Reaktionsproduktes 2,6-Dimethylbenzochinon darstellen (98). Eine Peroxidase soll durch Oxidation der entsprechenden phenolischen Vorstufen die Bildung von Lignin bewirken (99). A.M. Klibanov et al. setzten u.a. Tyrosin mit POD und Sauerstoff in Gegenwart von Dihydroxyfumarsäure zu der physiologisch wichtigen Substanz 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) um (100). B.N. Alberti und A.M. Klibanov gelang es, aromatische Amine und Phenole aus verdünnten Lösungen durch oxidative Polymerisation weitestgehend auszufällen. Sie schlugen dieses Verfahren zur Reinigung industrieller Abwässer vor (101).

2.2.5.2 Kupplung von Peroxidase an Träger 1 (PP 1 - PP 10)

Träger 1 und POD wurden in der gleichen Weise umgesetzt, wie es schon für die entsprechenden trypsinhaltigen Konjugate beschrieben worden ist (Kapitel 2.2.1.1). Das Aktivierungsreagenz für die Carboxylgruppen des Trägers 1 war wieder das dort erwähnte CDI. Die Reaktionszeiten lagen bei 22 bzw. 46 Stunden, die pH-Werte der Ansätze lagen bei 4 bzw. 6. Nach einer halben Stunde Reaktionszeit für Polymer und CDI wurde das Enzym zugegeben. Die Mischung wurde noch eine halbe Stunde bei Raumtemperatur gerührt und bei 4°C gelagert.

In Tabelle 18 sind die dargestellten Konjugate aufgeführt. Zur Bestimmung des Eiweißgehaltes s. Kapitel 2.2.5.4.

Tabelle 18

Konjugate aus Träger 1 und POD. Abhängigkeit der Zusammensetzung von den Reaktionsbedingungen

Konjugat	Mengenverhältnis der Komponenten im Ansatz Träger/CDI/POD			Reaktions- pH	zeit (h)	Eiweißgehalt (Gew.%)
PP 1	5	1	1	4	22	3,3
PP 2 F1	5	2	1	4	22	3,9
PP 2 F2						3,4
PP 3 F1	5	4	1	4	22	6,0
PP 3 F2						4,2
PP 4	5	4	2	4	22	9,0
PP 5	5	8	2	4	22	12,7
PP 6	5	4	2	6	22	6,0
PP 7	5	4	2	6	46	7,8
PP 8	5	4	1	6	46	6,9
PP 9	5	2	2	6	46	7,7
PP 10	5	2	1	6	46	3,8

2.2.5.3 Isolierung und Reinigung der Konjugate aus Träger 1 und Peroxidase

Es wurde versucht, die Kupplungsprodukte von Träger 1 und POD mit Hilfe der präparativen Elektrofokussierung, Ammoniumsulfatfällung und Gelchromatographie zu reinigen.

Die präparative Elektrofokussierung wurde als Flachbettelektrofokussierung durchgeführt. Das Gelbett bestand aus einem speziell gereinigten Dextrangel der Firma LKB und einer Ampholytmischung, die nach der Entwicklung des pH-Gradienten im Gel den Bereich pH 4 - 9 abdecken sollte. Mit dieser Fokussierung sollte erprobt werden, ob die POD unter den Bedingungen der Elektrofokussierung stabil ist. Eine Trennung von polymergebundenem Enzym und nativem Enzym wäre nur möglich gewesen, wenn der pH-Bereich des Ampholyten enger gefaßt worden wäre, da eines der Isoenzyme der POD einen IEP im schwach sauren Bereich zeigt. In diesem Bereich war auch das gesuchte Kupplungsprodukt von Träger 1 und POD zu erwarten, da wie bei den trypsinhaltigen Konjugaten im wesentlichen das Polymere den isoelektrischen Punkt des Produktes bestimmen sollte. Nach Beendigung der Elektrofokussierung wurde das Gel in zwei Bereiche eingeteilt, einen sauren mit dem pH-Bereich 4 - 6 und einen neutralen bzw. schwach alkalischen mit dem pH-Bereich 6 - 9. Die Gelfraktionen wurden eluiert, und das Eluat gefriergetrocknet. Schließlich wurde das so erhaltene Substanzgemisch, das neben dem gewünschten Produkt auch noch den Trägerampholyten enthielt, in etwas Natriumbikarbonat gelöst und auf eine kurze Säule mit Sephadex G-25 gegeben. Es wurden zwei Fraktionen des Eluates aufgefangen. Es wurde lyophilisiert und die enzymatische Aktivität der Lyophilisate bestimmt. Beide Proben zeigten eine zu vernachlässigende Aktivität, so daß die präparative Elektrofokussierung als Methode zur Reinigung von Enzym-Polymer-Konjugaten nicht weiter eingesetzt wurde. Es wurde nicht untersucht, an welcher Stelle des Verfahrens die Aktivität des Enzyms zerstört worden ist.

Das zweite Verfahren der Isolierung von (Träger 1/POD)-Konjugaten war, wie bei den (Träger 1/Trypsin)-Konjugaten, die Ammoniumsulfatfällung. Es trat hier das gleiche Problem wie bei den trypsinhaltigen Produkten auf. Die Konjugate waren nicht in allen Fällen frei von nativem Enzym. Der Nachweis mittels analytischer Elektrofokussierung gestaltete sich dadurch schwierig, daß, wie oben erwähnt, sowohl ein Isoenzym der POD als auch die

Konjugate mit Träger 1 ihre IEPs im sauren Bereich haben. Ein sicherer Hinweis auf ungebundenes Enzym wurde durch die Bestimmung der Aktivität der Produkte erhalten, die aufgrund der hohen Aktivität des nativen Enzyms auch schon bei Anwesenheit kleiner Mengen freier POD stark anstieg.

Das dritte Verfahren zur Reinigung und Isolierung der (Träger 1/POD)-Konjugate war die Gelchromatographie.

Als Gel wurde Sephadex G-100 eingesetzt, dessen Ausschlußgrenze für globuläre Proteine 150000 D und für Dextrane 100000 D beträgt. Die Grenzen sind hoch genug, um die POD mit einer Molmasse von ca. 42000 D von den Konjugaten, für die ein wesentlich höheres Molgewicht erwartet wurde, abtrennen zu können. Bei einer Säulenhöhe von 35-37 cm und einem Säulendurchmesser von 2,6 cm betrug das Gelvolumen ca. 170-200 cm³. Das Volumen des Reaktionsansatzes lag mit ungefähr 2 ml noch weit unter dem maximalen Probenvolumen, das gerade noch eine ausreichende Trennung der Komponenten erlaubt. Das maximale Probenvolumen sollte 5 % des Säulenvolumens nicht übersteigen. Als Elutionsmittel wurde Phosphatpuffer (pH 6,6) eingesetzt, der mit NaCl versetzt war, um die Ionenstärke zu erhöhen. Bei zu geringer Ionenstärke können positiv geladene Moleküle der Probenlösung mit Carboxylgruppen, die in geringer Anzahl im Sephadex enthalten sind, in Wechselwirkung treten (102). Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 14-16 ml/h. Der Verlauf der Elution wurde mit Hilfe eines Photometers verfolgt und über einen Schreiber aufgezeichnet. Das Ausschlußvolumen V_0 der Gelsäule wurde bestimmt, indem das Elutionsvolumen V_e von Dextranblau bestimmt wurde. Dextranblau ist ein Dextran, an das kovalent ein blauer Farbstoff gebunden ist. Die Molmasse liegt bei ca. $2 \cdot 10^6$ D. Das Molekül ist so groß, daß es in allen Sephadex-Gelen im Ausschlußvolumen durch die Gelsäule wandert.

Bei der Reinigung der (Träger 1/POD)-Konjugate mit Sephadex G-100 erschien die erste Fraktion nach einem Elutionsvolumen V_e , das dem Ausschlußvolumen der Säule entsprach. Die Fraktion wurde gewechselt, als die Extinktion ungefähr wieder auf die Hälfte ihres maximalen Wertes abgesunken war. In einigen Fällen wurde der erste Peak in zwei Fraktionen aufgeteilt, um zu sehen, inwieweit die erste Fraktion einheitlich war. Abb. 21 zeigt die Elutionskurve des Konjugates PP 9, aufgenommen bei den Wellenlängen 254 nm und 405 nm, als Beispiel für die Reinigung des POD-haltigen Konjugates.

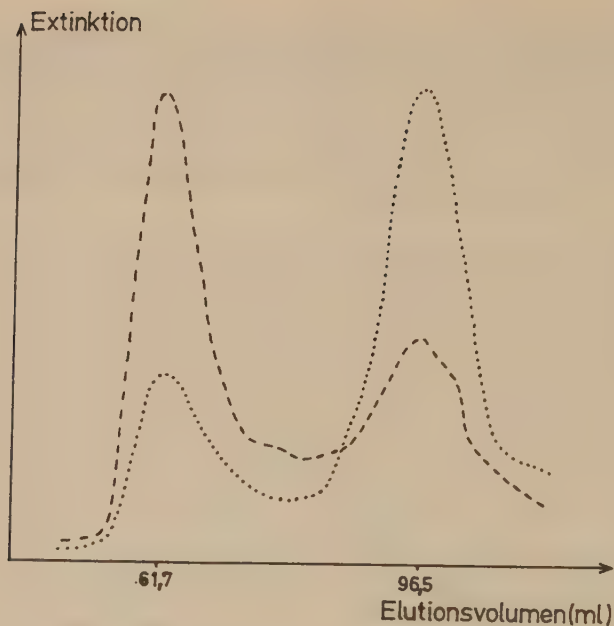


Abb. 21: Elutionskurve des Konjugates PP 9 an Sephadex G-100
(---- 254 nm, 405 nm) Säulenvolumen 196 ml, Höhe 37 cm

Bei 254 nm absorbierte überwiegend der polymere Träger, bei 405 nm zeigte das Enzym eine Absorptionsbande (s. Kapitel 2.2.5.4). Der Peak bei einem Elutionsvolumen von 61,7 mL, dem Ausschlußvolumen der verwendeten Gelsäule, zeigte das Erscheinen des Konjugates PP 9, das nur einen geringen POD-Gehalt aufwies (s. Tabelle 18; geringe Absorption bei 405 nm). Dagegen weist der Peak beim Elutionsvolumen 96,5 mL auf beträchtliche Mengen an freier POD hin (starke Absorption bei 405 nm), dem Überschuß aus der Kupplungsreaktion.

Im Anschluß an die Gelchromatographie wurden die Fraktionen des Eluates einer Membranfiltration (Ausschlußgrenze 50000 D) zur Entsalzung unterworfen. Die entsalzten Proben wurden schließlich lyophilisiert.

Mit Hilfe der Gelchromatographie können auch Molmassen abgeschätzt werden, die innerhalb des Fraktionierungsbereiches des verwendeten Geles liegen. Voraussetzung dafür ist, daß die Eluation der untersuchten Substanzen nicht durch Adsorptionseffekte an der Gelmatrix verzögert wird. Mit Hilfe

von Eichsubstanzen mit bekannter molarer Masse und ähnlichen Molekülformen wie die Proben lassen sich Eichkurven aufstellen. Den bekannten Molmassen werden z.B. das Elutionsvolumen V_e der jeweiligen Substanz (103) oder der Quotient aus Elutionsvolumen und Ausschlußvolumen V_e/V_0 gegenübergestellt (104). Diese Meßgrößen haben den Nachteil, nur für eine bestimmte Gelsäule anwendbar zu sein. Günstiger für die Bestimmung der Molmasse, weil von den Säulendimensionen und der Packungsdichte unabhängig, ist der Verteilungs-

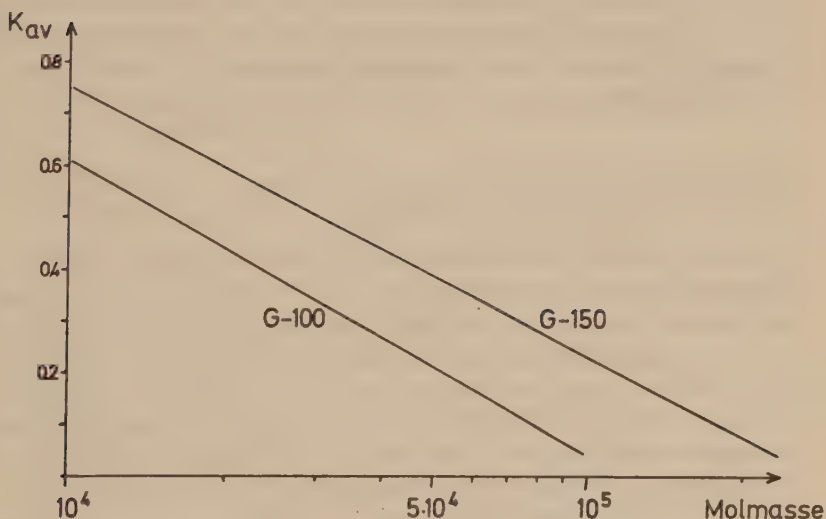


Abb. 22: Selektivitätskurve für die Sephadexgele G-100 und G-150
(gültig für globuläre Substanzen)

koeffizient K_{av} . Für diesen gilt

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad (V_e: \text{Elutionsvolumen, } V_0: \text{Ausschlußvolumen, } V_t: \text{Gesamtvolumen der Säule})$$

Alle hier auftretenden Volumengrößen sind leicht bestimmbar. K_{av} kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. $K_{av} = 0$ gilt, wenn das Elutionsvolumen einer Substanz gleich dem Ausschlußvolumen ist. $K_{av} = 1$ gilt, wenn das

Elutionsvolumen einer Substanz gleich dem Gesamtvolumen V_t der Säule ist. In welcher Beziehung K_{av} und die molare Masse zueinander stehen, kann einer Broschüre der Firma Pharmacia AB entnommen werden (Abb. 22) (102). Mit den in Abb. 21 angegebenen Elutionsvolumina der beiden Peaks, wobei hier für den ersten Peak $V_e = V_o$ gilt und somit das Ausschlußvolumen V_o bestimmt wird, und dem Volumen der Gelsäule von 196 ml läßt sich der K_{av} -Wert des zweiten Peaks zu 0,26 berechnen. Nach Abb. 22 läßt sich damit eine molare Masse von ca. 42000 g/Mol bestimmen. Dieses stimmt sehr gut mit Literaturwerten für die Molmasse der POD überein. Über die molare Masse des Konjugates PP 9 kann nur ausgesagt werden, daß sie größer als 150000 D ist, da die Substanz im Ausschlußvolumen der Säule, d.h. außerhalb des Fraktionierungsbereiches von Sephadex G-100, eluiert worden ist.

2.2.5.4 Bestimmung des Eiweißgehaltes

Zur Bestimmung des Eiweißgehaltes der (Träger1/POD)-Konjugate wurde die für Porphyrinsysteme typische Absorption bei ca. 405 nm, die sogenannte Soret-Bande, herangezogen. Der genaue Wert der Wellenlänge schwankt etwas. Je nach der Umgebung des Porphyrinringes werden ein wenig höhere oder niedrigere Werte gefunden. Um den Einfluß der Trübungen, die in den Lösungen der Konjugate zuweilen auftraten, zu unterdrücken, wurde die Differenz der Extinktionswerte bei 400 nm und 500 nm ausgewertet. Mit nativer Peroxidase wurde eine Eichgerade angefertigt. In einzelnen Fällen, in denen die Lösungen der Konjugate sehr trübe waren, wurde etwas Bikarbonatlösung zugesetzt. Dieser Zusatz führte bei Proben, die in Wasser ohne diesen klar löslich waren, nicht zu Abweichungen des Eiweißgehaltes, die außerhalb der Streuung der Ergebnisse lagen. Als Vergleich diente in allen Fällen die verwendete POD-Charge. Bei den Messungen konnte nicht berücksichtigt werden, daß die hier eingesetzte POD nur einen Extinktionskoeffizienten von $41,9 \text{ mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ aufwies, wenn eine molare Masse von 42000 g/mol zugrundegelegt wurde. In der Literatur wurden Werte um $105 \text{ mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (105) beschrieben. Auch die Reinheitszahl lag, wie in Kapitel 2.2.5.1 erwähnt, deutlich unter den Werten, die für gereinigte Präparate beschrieben worden sind.

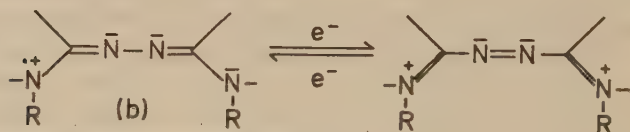
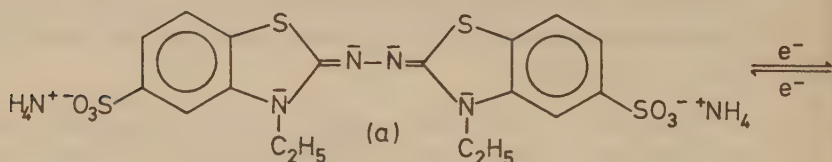
Die gebundenen Eiweißmengen sind sehr gering (Tabelle 18, Kapitel 2.2.5.2). Das ist auch an den getrockneten Produkten erkennbar, die im Gegensatz zur kräftig rotbraunen POD fast farblos bis leicht rötlich sind. In der Reihe PP 1 bis PP 3 wurden je 50 mg Träger 10 mg Enzym angeboten, entsprechend 17 % Enzym in der Mischung. PP 1 enthielt nur 3,3 % Eiweiß, der Anteil an POD im Konjugat konnte mit steigender Menge an CDI bei PP 3 auf 6 % Eiweiß gesteigert werden. Im letzteren Fall betrug die Bindungsausbeute nur ungefähr 30 %. Wird das Angebot an POD erhöht, so wird nicht mehr wie bei PP 3 ein POD/CDI-Mengenverhältnis von 1 zu 4 benötigt, um eine Bindungsausbeute von ca. 30 % zu erreichen. Hier genügte schon ein Mengenverhältnis von 1 zu 2 wie im Falle von PP 4. Bei einem Angebot von 28,5 % POD in der Polymer/Enzymmischung und einem POD/CDI-Verhältnis von 1 zu 4 wurde schließlich bei PP 5 eine Ausnutzung der angebotenen POD von 44 % errechnet.

Bei PP 2 und PP 3 wurde das den ersten Peak bildende Eluat der gelchromatographischen Trennung in je zwei Fraktionen aufgeteilt. Dabei enthielten die zuerst eluierten Anteile der Konjugate mehr Eiweiß als die später eluierten Anteile. Da die Breite des ersten Peaks bei der Trennung nicht nur durch die Diffusion der gelösten Teilchen, sondern auch durch die Heterogenität des Gelösten verursacht wird, kann man annehmen, daß in den später eluierten Anteilen des ersten Peaks zunehmend etwas kleinere Moleküle enthalten sind. Dies stimmt mit den Resultaten überein, die für die trypsinhaltigen Konjugate erhalten worden sind. Auch hier besaßen die Moleküle mit dem geringeren Eiweißgehalt die geringere molare Masse.

Als Vergleich zu den Konjugaten, die bei pH 4 und einem Tag Reaktionszeit dargestellt worden sind, wurde ein Konjugat durch eintägige Reaktion bei pH 6 und vier weitere Konjugate durch zweitägige Reaktion bei pH 6 dargestellt (s. Tabelle 18, Kapitel 2.2.5.2). Die Änderung des pH-Wertes des Kupplungsansatzes von 4 auf 6 und die Verdoppelung der Reaktionszeit bewirkten keine Erhöhung der Menge an gebundener POD. Wenn auch PP 7 deutlich mehr POD enthält als PP 6 bei gleichem Reaktions-pH und verlängerter Reaktionszeit, so zeigen doch die Vergleiche von PP 2 F1 und PP 10 bzw. PP 3 F1 und PP 8, daß diese Konjugatpaare jeweils einen ähnlichen Eiweißgehalt aufweisen. Daraus ist zu erkennen, daß die Veränderung der Reaktionsbedingungen (Reaktions-pH und Reaktionsdauer) keine größeren Veränderungen des Eiweißgehaltes herbeiführte, so daß dieser vor allem von dem Mengenverhältnis der Komponenten im Ansatz abhing.

2.2.5.5 Bestimmung der Aktivität von (Träger 1/POD)-Konjugaten

Die enzymatische Aktivität der POD und ihrer Konjugate wurde optisch durch Umsetzung des Ammoniumsalzes der 2,2'-Azino-di-[3-äthyl-benzthiazolin-sulfonsäure-6] (ABTS, a) als Wasserstoffdonator mit Wasserstoffperoxid als Wasserstoffakzeptor bestimmt. ABTS ist von S. Hünig synthetisiert worden (106) und wurde als Substrat für Oxidasen erstmals von W. Werner et al. beschrieben (107). Diese Autoren geben auch den molaren Extinktionskoeffizienten ϵ für das bei der Reaktion mit POD und H_2O_2 entstehende



blaugrüne Radikalkation (b) von ϵ_{436} : $29,3 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$ an. Die Abhängigkeit der Aktivität der POD vom pH-Wert und den Konzentrationen der Substrate H_2O_2 und ABTS ist von H. Gallati untersucht worden (108). Für reproduzierbare Bestimmungen der Aktivität müssen alle drei Parameter, pH, H_2O_2 -Konzentration und ABTS-Konzentration konstant gehalten werden. Zur Eliminierung des Einflusses möglicher Schwankungen der Konzentrationen wurde als Bezugswert bei Bestimmungen der Aktivität jeweils auch die Aktivität nativer POD bestimmt. Die von W. Werner angegebenen Bedingungen wurden leicht modifiziert.

In Tab. 19 sind die Aktivitäten der Konjugate PP 1 bis PP 10 angeführt. Dazu ist die jeweilige relative Aktivität angegeben. Die Konjugate sind in zwei Gruppen einteilbar. Die Gruppe der Konjugate PP 1 bis PP 5 zeigte

eine geringe bis mäßige relative Aktivität, während in der Gruppe PP 7 bis PP 10 eine hohe relative Aktivität gefunden worden ist. Die erste Gruppe der Konjugate hatte einen Tag bei pH 4 mit dem Träger 1 reagiert, die zweite Gruppe zwei Tage bei pH 6. Zwischen beiden Gruppen befindet sich PP 6, das bei pH 6 einen Tag mit Träger 1 umgesetzt worden ist. Die Ursache für die aus dem Rahmen der übrigen Konjugate fallende geringe Aktivität von PP 1 ist unbekannt. Das Konjugat PP 5 war nur wenig in Wasser löslich. Der hohe Anteil an CDI im Reaktionsansatz (vgl. Tabelle 18) hat offensichtlich zu Vernetzungen in einem solchen Maße geführt, daß die Auflösungsgeschwindigkeit der während der Gelchromatographie noch gelösten Substanz sehr gering geworden oder das Konjugat teilweise unlöslich geworden ist.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Art der Bindung des Enzyms an den polymeren Träger bei pH 6 günstiger als bei pH 4 ist, wie es auch schon für die (Träger 1/Trypsin)-Konjugate gefunden wurde. Bei ähnlichen Mengen an gebundenem Enzym wurden bei dem höheren Umsetzungs-pH wesentlich höhere relative Aktivitäten gefunden. Ein großer Überschuß an CDI gegenüber der POD führte nicht zu einer stark verminderten relativen Aktivität wie bei den (Träger 1/Trypsin)-Konjugaten.

Tabelle 19

Aktivität der (Träger 1/POD)-Konjugate

Konjugat	Eiweißgehalt (Gew.%)	Reaktions-pH	Aktivität (U/mg Konj.)	relative Aktivität (%)
PP 1	3,3	4	0,04	1,8
PP 2 F1	3,9	4	0,49	19,4
PP 3 F1	6,0	4	0,76	19,8
PP 4	9,0	4	1,51	27,6
PP 5	12,7	4	0,55	6,7
PP 6	6,0	6	2,10	43,1
PP 7	7,8	6	3,18	50,0
PP 8	6,9	6	4,64	87,5
PP 9	7,7	6	4,62	77,2
PP 10	3,8	6	2,18	74,0

2.2.5.6 Untersuchung der Thermostabilität der (Träger 1/POD)-Konjugate

Von drei POD-haltigen Konjugaten und zum Vergleich von nativer POD wurde die Abnahme der Aktivität bei Inkubation einer wäßrigen Lösung bei 60°C untersucht. Die Thermostabilität der freien POD ist schon von H. Theorell und A.C. Maehly (109) untersucht worden. Die Autoren stellten fest, daß das Enzym bei 60°C seine Aktivität für 15 Minuten behielt. Eine ausführlichere Untersuchung der Thermostabilität zweiter Peroxidasen aus Meerrettich und Spinat haben K.H. Park und A. Fricker durchgeführt (110). Im Rahmen ihrer Arbeiten über die Hitzeinaktivierung von Enzymen in Lebensmitteln untersuchten sie die Geschwindigkeit der POD-Inaktivierung bei verschiedenen Temperaturen und pH-Werten. Sie fanden, daß die Inaktivierung in zwei Phasen verläuft, einer kurzen Phase von nur wenigen Minuten mit einer schnellen Inaktivierung folgt die zweite Phase, in der dieser Prozeß deutlich verlangsamt ist. Die Autoren schließen daraus, daß die Inaktivierung nicht nach einer Reaktion 1. Ordnung verläuft. Eine Ursache für dieses Verhalten wird nicht angegeben. Die Inaktivierungsgeschwindigkeit der ersten Phase ist kaum pH-abhängig, die Geschwindigkeit der zweiten Phase hat ein Minimum zwischen pH 6 und pH 7. Den Einfluß einer chemischen Modifizierung von POD auf die thermische Stabilität untersuchten N.N. Ugarova et al. (111). POD, die mit Maleinsäureanhydrid bzw. mit inerten Proteinen umgesetzt worden ist, zeigte eine 25-90 - fache Erhöhung der thermischen Stabilität.

Bei den eigenen Untersuchungen zeigte sich, daß die native POD schon nach sehr kurzer Zeit einen Teil ihrer enzymatischen Aktivität verlor. Nach fünf Stunden waren noch 50 % der Anfangsaktivität vorhanden (Abb. 23). Die beiden Konjugate PP 2 und PP 4 unterschieden sich in ihrer Thermostabilität nicht. PP 2 und PP 4 sind durch Umsetzung von POD mit Träger 1 bei pH 4 dargestellt worden. Dabei ist PP 2 ein Konjugat mit einem niedrigen und PP 4 ein Konjugat mit einem relativ hohen Enzymgehalt. Für wenige Minuten blieb die Anfangsaktivität der beiden Konjugate erhalten. Nach fünfständiger Erhitzung auf 60°C wurden noch 70 % der ursprünglichen Aktivität gefunden. Als noch stabiler als die bereits erwähnten Konjugate erwies sich PP 8, ein Vertreter der durch eine zweitägige Kupplungsreaktion bei pH 6 dargestellten Konjugate. Hier nahm zwar die Aktivität zu Beginn der Inkubation bei 60°C stärker ab, ähnlich wie bei der nativen POD, hielt sich dann aber auf einem hohen Niveau, so daß nach fünf Stunden noch

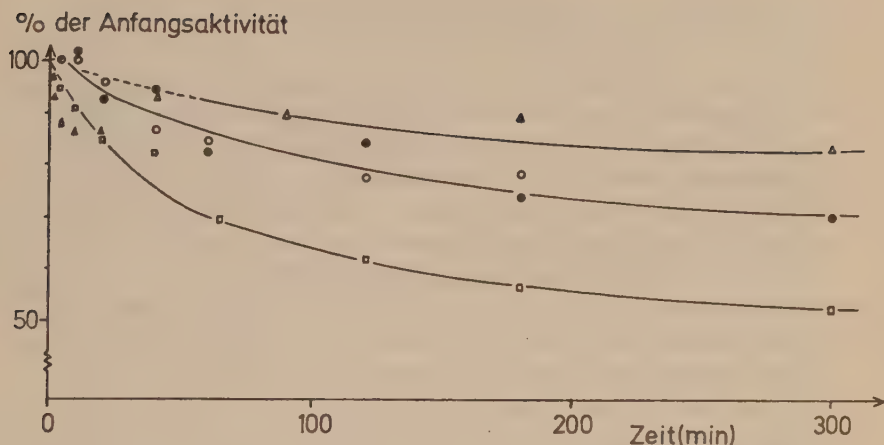


Abb. 23: Thermische Stabilität von(Träger 1/POD)-Konjugaten und von nativer POD bei Inkubation bei 60°C in wäßriger Lösung (o PP 2; ● PP 4; ▲ PP 8; □ POD)

über 80 % der Anfangsaktivität gefunden wurden. Die von K.H. Park und A. Fricker beschriebenen zwei Phasen der Inaktivierung wurden nicht gefunden, möglicherweise weil die Zeitabstände zwischen den ersten Probenentnahmen zu groß waren. Auch die Ergebnisse von H. Theorell und A.C. Maehly wurden nicht wiedergefunden. Die Ursache für die Diskrepanzen bei der Bestimmung der Thermostabilität von POD kann darin liegen, daß der Verlauf der Hitzeaktivierung sehr stark von der Enzymherkunft und von Milieufaktoren abhängt (110).

Wenn sich auch die native POD mit einer Aktivität von 50 % der Anfangsaktivität nach fünf Stunden bei 60°C als recht stabil erwies, verglichen z.B. mit Trypsin, konnte dennoch durch die kovalente Bindung der POD an Träger 1 eine weitere beträchtliche Erhöhung der Thermostabilität erreicht werden.

2.2.5.7 Umsetzung von POD mit Carbodiimid

Wie auch Trypsin wurde POD mit CDI unter den gleichen Bedingungen bei pH 4 umgesetzt, unter denen das Enzym mit Träger 1 umgesetzt worden ist. Die Reaktionsmischung wurde über eine Sephadex G-100-Säule gegeben. Anschließend wurde das Eluat durch Membranfiltration von den Puffersalzen befreit. Nach einem Elutionsvolumen V_e , bei dem die (Träger 1/POD)-Konjugate auf der gleichen Säule schon eluiert worden sind, war im vorliegenden Fall kein Peak erkennbar. Das Eluat enthielt zwar Substanz, wie sich nach der Entsalzung und Gefriertrocknung zeigte, die Mengen waren aber so gering, daß sie nicht weiter untersucht worden sind. Ein größerer Peak erschien erst nach einem V_e , bei dem auch in den anderen Fällen überschüssiges freies Enzym eluiert worden ist. Man kann also wie bei den trypsinhaltigen Konjugaten annehmen, daß Kupplungsprodukte, die durch eine Enzym-Enzym-Kupplung entstanden sind, in den POD-haltigen Konjugaten nicht enthalten sind.

2.2.6 Konjugate aus Träger 4a und Peroxidase

2.2.6.1 Kupplung und Isolierung

Die Träger 4a - 4c enthielten 2-(3-Aminophenyl)-1, 3-dioxolan als reaktive Gruppe. Zur Kupplung von Trypsin waren sie nicht geeignet, da berichtet worden ist, daß die Aktivität des Trypsins durch eine Diazoniumkupplung weitgehend zerstört wird (82).

Da die Polymeren während der Umsetzung mit dem Dioxolan offenbar leicht vernetzt worden waren, was ihrer stark verminderten Löslichkeit in Wasser entnommen werden konnte, wurde nur Träger 4a zur kovalenten Bindung von POD eingesetzt. Träger 4a zeigte den geringsten Gehalt an reaktiven Gruppen. Für die Aktivierung der aromatischen Aminogruppe wurde das Polymere durch mehrstündiges Erwärmen in Wasser in Lösung gebracht und in salzsaurer Lösung unter Kühlung mit Nitrit zum Diazoniumkation umgesetzt. Das Enzym wurde in fester Form zur schwach alkalischen Lösung des Diazoniumsalzes gegeben. Die Kupplungsreaktion mit dem Enzym lief langsam ab. Erst nach mehreren Stunden war die Kupplung so weit fortgeschritten, daß der Reaktionsansatz gelierte. Teile eines solchen Konjugates waren noch in

Wasser löslich, diese Produkte sind aber nicht weiter untersucht worden. Um die Gelbildung zu verhindern, wurden verschiedene niedermolekulare Phenole als Kupplungspartner zugesetzt. Sie sollten die Reaktion des Polymeren mit der POD nach ungefähr einer Stunde durch die Reaktion mit noch nicht umgesetzten Diazoniumgruppen abbrechen. Ein Zusatz von Resorcin führte sofort zu unlöslichen Produkten. Seine beiden Hydroxylgruppen aktivierten den aromatischen Ring offensichtlich so stark, daß es mit zwei Diazoniumgruppen reagieren konnte und so als Vernetzer wirkte. Mit Tyrosin wurde kein Effekt beobachtet, seine Löslichkeit war unter den gegebenen Reaktionsbedingungen zu gering. Ein gutes Resultat erbrachte die Anwendung von Natriumsalicylat. In seiner Eigenschaft als Salz war es sehr gut in Wasser löslich und durch die Anwesenheit einer Carboxylatgruppe war der aromatische Ring nur mäßig reaktiv. Nach der Zugabe von Natriumsalicylat konnten die Konjugate noch bei 4°C über Nacht zu Ende reagieren. Ihre Reinigung wurde mittels Gelchromatographie mit Sephadex G-100 durchgeführt, wie es schon bei den (Träger 1/POD)-Konjugaten beschrieben worden ist. Schwierigkeiten ergaben sich dadurch, daß zuweilen Teile des Konjugates während der Elution auf dem feinen Sieb am Ende der Gelsäule ausfielen und die Säule verstopften.

Von den so dargestellten Konjugaten wurde nur eines näher untersucht. Dieses Konjugat - PP 11 - wurde hergestellt, indem 40 mg Träger 4a nach der Diazotierung wie beschrieben mit 5 mg POD reagierten. Das bei der gelchromatographischen Reinigung erhaltene Eluat wurde nicht getrocknet, da sich herausgestellt hatte, daß die mit Träger 4a erhaltenen Produkte nach der Gefriertrocknung nicht mehr in Wasser löslich waren. Nach dem Auffüllen der Produktfraktion des Eluates mit PP 11 auf ein bekanntes Volumen, wurde ein Teil davon durch Ultrafiltration entsalzt und lyophilisiert, um den Gehalt an Konjugat bestimmen zu können. Als Ausbeute wurden 16,3 mg Konjugat gefunden. Die Aktivität betrug 0,6 U/mg.

2.2.6.2 Versuche zur Bestimmung des Eiweißgehaltes des Konjugates PP 11

Wie das Spektrum des Konjugates PP 11 zeigt (Abb. 24), ist im Bereich von 400 - 410 nm kein Peak erkennbar, der wie bei den (Träger 1/POD)-Konjugaten die direkte optische Bestimmung des POD-Gehaltes gestattet hätte. Der Peak bei 350 nm ist auf die bei der Kupplungsreaktion des Polymeren mit Salicylsäure und Tyrosinresten des Enzyms gebildete Diazoniumgruppierung zurückzuführen. Als Hauptbestandteil des chromophoren Systems ist 2-Hydroxydiazobenzol denkbar, das seine stärkste Absorption bei 325 nm zeigt (112). Aufgrund des unbekannten Salicylsäuregehaltes des Konjugates konnte der Peak bei 350 nm nicht zur Ermittlung des Eiweißgehaltes von PP 11 herangezogen werden.

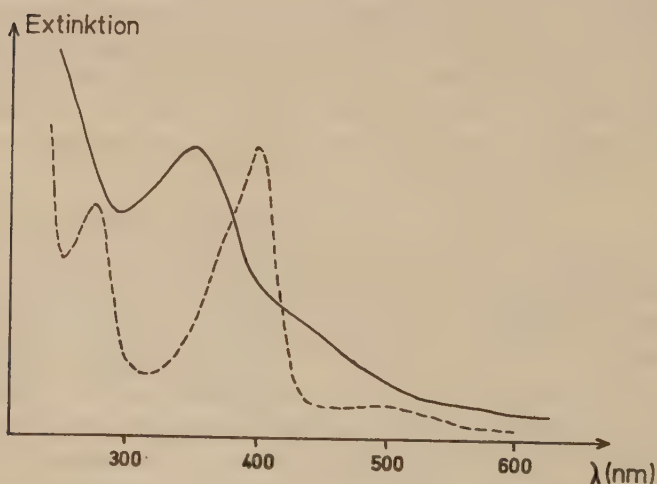


Abb. 24: UV/VIS-Spektrum des Konjugates PP 11 und der nativen POD
(— PP, ---- POD)

Um dennoch eine photometrische Bestimmung des Enzymgehaltes vornehmen zu können, wurde versucht, auf Absorptionen im längerwelligen Bereich auszuweichen. Die native POD zeigt nur Peaks mit kleinen Extinktionskoeffizienten im Bereich oberhalb von 500 nm. Es gibt aber eine Reihe von Derivaten der POD mit stärkeren Absorptionen im längerwelligen Bereich. So beschreiben D. Keilin und E.F. Hartree ein POD-Derivat, das durch eine Reaktion

des Enzyms mit einem Überschuß an Wasserstoffperoxid entstand (113). Sie geben für die Lage der beiden entstehenden Peaks 583 nm und 546 nm an, in der vorliegenden Arbeit wurden 576 nm und 542 nm gefunden. Vermutlich sind die jeweils verwendeten Photometer die Ursache der Abweichungen der Meßwerte. Die mit Wasserstoffperoxid entstehende Verbindung wurde von D. Keilin und E.F. Hartree "complex III" genannt. Sie ist nicht stabil, der H_2O_2 -Überschuß führt zur Zerstörung des Enzyms. Die Peaks waren dennoch zur quantitativen Bestimmung der freien POD verwendbar, wenn die Messungen schnell durchgeführt wurden. Sowohl der Peak bei 576 nm als auch dessen erste Ableitung ergaben eine lineare Abhängigkeit von der POD-Konzentration bei konstanter H_2O_2 -Konzentration. Die Bestimmung des Enzymgehaltes im Konjugat PP 11 gelang dennoch nicht, da dessen Spektrum durch den Zusatz von Wasserstoffperoxid nicht verändert wurde.

Eine weitere Möglichkeit der Derivatisierung von POD stellt die Reaktion mit Pyridin/Natronlauge und Natriumdithionit dar, wie sie z.B. von K.G. Paul et al. beschrieben worden ist (114). Bei dieser Reaktion erscheinen zwei Peaks bei 557 nm und 526 nm, die auf Veränderungen am Hämin-Anteil der POD zurückzuführen sind. Aber auch unter diesen Bedingungen zeigte PP 11 keine Reaktion.

Als weitere Methode zur Bestimmung des POD-Gehaltes wurde die Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) erprobt. Dabei sollte der Eisengehalt der Konjugatproben bestimmt werden, um Aussagen über den Enzymgehalt machen zu können. Da ein POD-Molekül eine Hämingruppe mit einem Eisenatom als Zentralatom enthält, wären die gewünschten Rückschlüsse möglich gewesen. Es zeigte sich aber leider schon bei den ersten Untersuchungen, daß der Einsatz der AAS nicht möglich war. Die zur Verfügung stehenden Substanzmengen erlaubten nur die flammenlose Veraschung im elektrisch beheizten Graphitrohr. Unter diesen Bedingungen gelang es nicht, die Konjugate oder das freie Enzym so zu zerstören, daß auswertbare Meßsignale entstanden.

Auch die Folin-Probe auf Eiweiß sollte herangezogen werden (91). Allerdings zeigte sich schon bei den ersten Versuchen, daß diese Methode ebenfalls nicht anwendbar war, da auch der Träger 4a eine positive Farbreaktion lieferte. Für die Folin-Probe wurde das Polymer unter den gleichen Bedingungen wie bei der Darstellung von PP 11, nur ohne POD, mit Nitrit und

Salicylat umgesetzt, durch Dialyse von den enthaltenen Salzen befreit und mit alkalischer Kupfersalzlösung und mit dem Folin-Reagenz umgesetzt.

Nach den beschriebenen Versuchen sind keine Aussagen über den Gehalt an POD im Konjugat PP 11 möglich.

2.2.7 Konjugate aus den Trägern 5a - 5c und Peroxidase.

Nach der Umsetzung der aromatischen Aminogruppe der Träger 5a, 5b und 5c zum Diazoniumsalz war es möglich, Enzym an die Polymeren zu binden. Die Reaktion verlief ähnlich der bei Träger 4a. Die Kupplungsreaktion mit dem Enzym führte aber im Gegensatz zu Träger 4a auch bei längeren Reaktionszeiten nicht zu vernetzten Konjugaten, so daß auf den Zusatz niedermolekularer Phenole zur Blockierung überschüssiger Diazoniumgruppen verzichtet wurde. Zum Einsatz kamen die Träger 5a, 5b und 5c, die sich in der Anzahl der reaktiven Gruppen voneinander unterschieden (s. Kapitel 2.1.4.2). Sie wurden mit jeweils der gleichen Menge an Enzym umgesetzt. Nach der Reaktion über Nacht wurde die Reinigung der Konjugate wieder mit Hilfe der Gelchromatographie, wie schon bei PP 11 beschrieben, vorgenommen. Da auch diese Konjugate nach der Gefriertrocknung nicht mehr in Wasser löslich waren, wurden die das Konjugat enthaltenden Fraktionen der Eluate auf ein bekanntes Volumen aufgefüllt und nur Proben davon entsalzt und getrocknet, um den Produktgehalt zu bestimmen. Bei der Bestimmung des Enzymgehaltes traten die gleichen Schwierigkeiten wie bei PP 11 auf.

Tabelle 20

Eigenschaften der Konjugate aus den Trägern 5a, 5b, 5c und POD

Konjugat	PP 12	PP 13	PP 14
eingesetzter Träger a)	5a	5b	5c
Aktivität der Produktfraktion (Gelchromatographie an Sephadex G.100) $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{ml}$	1,10	0,97	0,10
Volumen der Produktfraktion mL	23,7	27,2	15,3
Konjugatgehalt der Produktfraktion mg/ml	1,10	1,08	0,83
Ausbeute mg	26,1	29,4	12,7
Aktivität der Konjugate U/mg	1,0	0,9	0,1

a) Je 40 mg Träger wurden in allen Fällen 5 mg POD eingesetzt.

Daher gelang es nicht den POD-Gehalt festzustellen. Die Eigenschaften der drei POD-haltigen Konjugate von Träger 5 sind in Tab. 20 aufgeführt. Der Vergleich dieser Konjugate mit denjenigen, bei denen Träger 1 eingesetzt worden ist, zeigt, daß die enzymatische Aktivität niedrig liegt, wobei allerdings berücksichtigt werden muß, daß bei einem möglicherweise geringen Enzymgehalt der Produkte aus Tabelle 20 eine hohe relative Aktivität gefunden werden könnte.

2.2.8 Untersuchung der Beständigkeit verschiedener POD-haltiger Konjugate gegenüber Wasserstoffperoxid

Im Rahmen der Versuche zur Bestimmung des POD-Gehaltes von Konjugaten, bei denen das Enzym über eine Diazogruppe gebunden war, war aufgefallen, daß das Konjugat PP 11 mit H_2O_2 nicht so reagierte, wie vermutet worden war. Dies war aus dem VIS-Spektrum des Konjugates ersichtlich, das nach Zugabe von H_2O_2 gegenüber dem Ausgangsspektrum nicht verändert war. Läßt man native POD oder auch Konjugate der Reihe PP 1 bis PP 10 mit H_2O_2 reagieren, so erhält man im Spektrum des sichtbaren Bereiches charakteristische Banden, die nicht beständig sind. Das Verschwinden dieser Banden im Laufe der Zeit ist ein Zeichen für die Zerstörung des Enzyms. Es wurde nun vermutet, daß das Fehlen von Banden der Reaktion des nativen Enzyms mit H_2O_2 ein Hinweis auf eine erhöhte Stabilität der kovalent gebundenen POD gegenüber diesem Reagenz sein könnte. Daher wurde die Aktivität einiger Konjugate bei konstanter ABTS-Konzentration und bei variierter Wasserstoffperoxidkonzentration bestimmt. Als Maß für die Beständigkeit der Konjugate und der nativen POD gegenüber dem Einwirken von H_2O_2 wurde zum einen der Anteil der Anfangsaktivität, der nach fünfminütiger Reaktion mit den Substraten H_2O_2 in der jeweiligen Konzentration und ABTS noch vorhanden war, bestimmt, zum anderen wurde diejenige Zeit bestimmt, nach der die enzymatische Aktivität der Proben zerstört war. Einen deutlichen Einfluß auf die Stabilität von POD zeigte H_2O_2 ab ungefähr 3 mmol/l.

Tabelle 21

Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Inaktivierung von nativer POD und POD-haltigen Konjugaten von der H_2O_2 -Konzentration

a) % der Anfangsaktivität nach fünfminütigem Umsatz mit ABTS/ H_2O_2 ^{a)}

H_2O_2 -Konzentration	POD _{nativ}	PP 4 ¹⁾	PP 8 ¹⁾	PP 11 ²⁾	PP 12 ³⁾
6,3 mmol/l	83	85	85	- b)	- b)
15,7 mmol/l	65	69	62	70	63
31,3 mmol/l	52	52	43	50	34

b) Zeit bis zur vollständigen Inaktivierung (min) ^{a)}

H_2O_2 -Konzentration	POD _{nativ}	PP 4	PP 8	PP 11	PP 12
15,7 mmol/l	19	18	15	18	- b)
31,3 mmol/l	12	12	10	11	9

1) s. Tabelle 18, Kapitel 2.2.5.2

2) s. Kapitel. 2.2.6.1

3) s. Tabelle 20, Kapitel 2.2.7

a) 2mM ABTS, 0,025 M Phosphatpuffer pH 7,0, 25°C

b) nicht bestimmt

Ähnliche Untersuchungen sind von H. Gallati (108) durchgeführt worden. Die Untersuchungsbedingungen wichen von den hier angewendeten Bedingungen etwas ab, insbesondere der pH-Wert der Aktivitätsmessung. H. Gallati fand, daß steigende H_2O_2 -Konzentrationen im untersuchten Bereich bis zu 20 mmol/l zu steigenden Anfangsaktivitäten führten. Hier wurde für native POD und für das Konjugat PP 8 ein Maximum der Anfangsaktivität bei 2-3 mmol/l gefunden (Abb. 25). Die Anfangsaktivitäten der anderen Konjugate aus Tabelle 21 sind in diesem Konzentrationsbereich nicht untersucht worden.

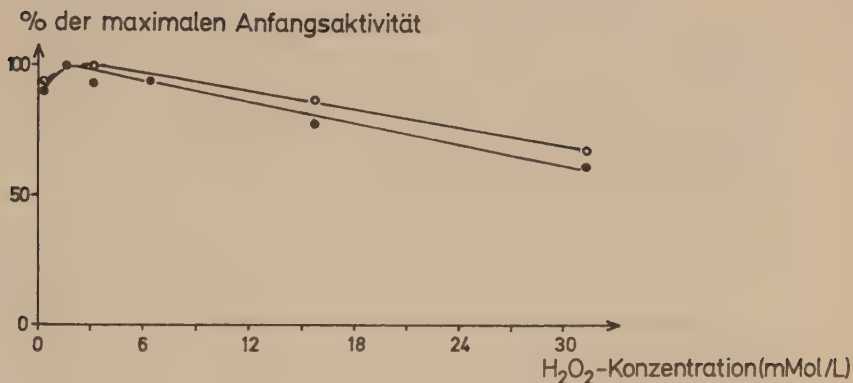


Abb. 25: Abhängigkeit der Anfangsaktivität von PP 8 (o) und nativer POD (●) von der H_2O_2 -Konzentration (Bestimmung mit 2 mM ABTS in 0,025 M Phosphatpuffer, pH 7, 25°C)

Im Rahmen der bei der Auswertung der Meßergebnisse möglichen Genauigkeit verhielten sich alle untersuchten Proben sehr ähnlich (Tabelle 21). Nur PP 12, in dem die POD wie in PP 11 über eine Diazogruppe gebunden ist, zeigte eine etwas höhere Empfindlichkeit gegenüber H_2O_2 als native POD und die übrigen Konjugate. Es ergaben sich also keine deutlichen Hinweise auf eine Modifizierung der POD durch die kovalente Bindung an lösliche Polymere, die dazu führt, daß das Enzym dann eine höhere Beständigkeit gegenüber Wasserstoffperoxid aufweist.

2.2.9. Konjugate aus Träger 7 und POD

Auch an Träger 7, einem Copolymer aus NVP und p-Aminostyrol, wurde POD durch eine Diazoniumkupplung gebunden. Die Kupplungsreaktion führte auch nach langen Reaktionszeiten nicht zu vernetzten Produkten. Die Fraktionierung der Reaktionsansätze wurde, wie bei den (Träger 1/POD)-Konjugaten beschrieben, mittels Gelchromatographie an Sephadex G-100 durchgeführt. Die Bestimmung des Enzymgehaltes war nicht möglich. Es traten die gleichen Schwierigkeiten auf, wie sie für PP 11 beschrieben worden sind (Kapitel 2.2.6.2).

Tabelle 22

Konjugate aus Träger 7 und POD

Konjugat	PP 15	PP 16
Massenverhältnis im Ansatz: Träger 7/POD	4/1	4/2
Aktivität U/mg Konjugat	0,4	0,5

Die enzymatischen Aktivitäten, deren Bestimmung wie bei den (Träger 1/POD)-Konjugaten erfolgte, lagen bei den beiden dargestellten Konjugaten recht niedrig, wenn man das hier eingesetzte Verhältnis der Polymermenge zur Enzymmenge mit demjenigen der (Träger 5a/5b/5c-POD)-Konjugate vergleicht (Tab. 20, Kapitel 2.2.7). Bei einem deutlich höheren Enzymsatz wurden mit Träger 7 nur halb so aktive Konjugate erhalten wie mit den oben genannten Trägern. Weitere Konjugate aus Träger 7 und POD wurden daher nicht dargestellt.

2.2.10 Konjugate aus Träger 1 und Aminoacylase

2.2.10.1 Aminoacylase

Die Eigenschaften nativer Aminoacylasen (E.C.3.5.1.14) sind bisher nur wenig untersucht worden (115, 116). Neuere umfassende Untersuchungen an Schweinenieren-Aminoacylase sind von W. Kördel und F. Schneider durchgeführt worden (117, 118). Danach ist dieses Enzym aus 772 Aminosäuren aufgebaut und zeigt eine molare Masse von 86000 D. Die Aminoacylase besteht nach den Ergebnissen der SDS-Gelelektrophorese aus zwei gleich großen Untereinheiten, die nicht durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Jede Untereinheit besitzt ein aktives Zentrum. Diese Zentren sind einzeln enzymatisch inaktiv, erst der Verband aus zwei Untereinheiten führt zum aktiven Enzym. Für die Aktivität essentiell ist die Anwesenheit von Zinkionen. Werden diese mit Komplexbildnern entfernt, wird das Enzym inaktiv. Die Zinkionen sind vermutlich über Histidin im Enzym gebunden. Eine chemische Modifizierung der Histidinmoleküle führt zur Inaktivierung der Aminoacylase. Ebenso notwendig für die enzymatische Aktivität sind zwei der vier Thiol-Gruppen im Molekül, zwei von vier Disulfidbrücken sowie je zwei Tryptophan- und Lysinmoleküle.

Aminocyclase katalysiert die Hydrolyse von N-Acyl-L-Aminosäuren. Dieses macht man sich für die Herstellung von L-Aminosäuren aus den racemischen Gemischen der N-Acylaminosäuren nutzbar. L-Aminosäuren sind diejenigen Aminosäuren, aus denen die Eiweiße von Pflanzen und Tieren im allgemeinen bestehen. Ein Versorgungsmangel mit essentiellen Aminosäuren kann nur durch die Aufnahme der L-Formen der Aminosäuren überwunden werden. Für technische Prozesse bestand daher schon lange ein Interesse an der Immobilisierung der Aminoacylase, die besonders in Japan vorangetrieben worden ist. I. Chibata et al. haben schon 1966 begonnen, Aminoacylase durch Adsorption zu immobilisieren. Diese Immobilisate waren bei höheren Ionenstärken nicht stabil, so daß in späteren Arbeiten die Immobilisierung durch eine kovalente Bindung an unlösliche reaktive Polymere vorgenommen wurde (5 und dort zitierte Literatur). Aus einer Vielzahl weiterer Arbeitsgruppen ist über unlösliche immobilisierte Acylase berichtet worden, dabei sind derivatisierte natürliche und synthetische Polymere eingesetzt worden. Insbesondere B. Szajáni hat eine Reihe synthetischer und halbsynthetischer unlöslicher Träger zur Bindung von Aminoacylase erprobt (119). Er untersuchte die Bindung über Diazoniumgruppen, über Isothiocyanate, Azide, Anhydride und Carboxylgruppen. Aktivierungsreagentien für letztere waren wasserlösliche Carbodiimide. Carboxylhaltige Träger sind von B. Szajáni besonders eingehend untersucht worden (120). Unter den entsprechenden unlöslichen Immobilisaten waren jene, die die höchsten Aktivitäten zeigten. Eine weitere Möglichkeit der Enzymimmobilisierung, der Einschluß in Membranreaktoren, ist für das freie Enzym von C. Wandrey untersucht worden (121). Er hat dabei eine Methode zur kontinuierlichen Bestimmung der Acylaseaktivität mit Hilfe der Polarimetrie ausgearbeitet.

Über wasserlösliche Polymer-Aminoacylase-Konjugate ist bislang noch nicht berichtet worden.

2.2.10.2 Kupplung und Reinigung der (Träger 1/Aminoacylase)-Konjugate

Die Aminoacylase wurde ähnlich wie Trypsin und POD an Träger 1 unter Verwendung von CDI als Kupplungskomponente immobilisiert. Dabei wurde die Acylase sowohl als lyophilisierte Substanz als auch als Aufschwemmung in 3,2 m $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eingesetzt. Aufgrund der oft nur schlechten Löslichkeit des lyophilisierten Enzyms wurde dieses nach den Vorversuchen nicht weiterverwendet.

Die Reaktionsbedingungen für die Kupplung waren die gleichen wie bei Trypsin. Nach zwei Tagen Reaktionszeit wurden die Ansätze auf Gelsäulen mit Sephacryl S-200 bzw. Sephadex G-150 gegeben. Der Fraktionierungsbereich von Sephacryl S-200 umfaßt für Proteine den Bereich 5000 - 250000 D, der von G-150 umfaßt den Bereich 5000 - 300000 D. Mit einer Molmasse von ca. 86000 D sollte das freie Enzym von den Konjugaten, die erfahrungsgemäß wesentlich höhere molare Massen zeigen, gut abtrennbar sein. Der Nachteil des Sephacrylgels ist sein höherer Gehalt an geladenen Gruppen verglichen mit Sephadexgelen. Um Adsorptionen von Konjugaten am Gel trotz hoher Ionenstärke des Elutionsmittels zu vermeiden, wurde im Verlaufe der Arbeit nur noch Sephadex G-150 eingesetzt.

Tabelle 23

Konjugate aus Träger 1 und Aminoacylase. Abhängigkeit der Eigenschaften von den Reaktionsbedingungen

Konjugat	PA 1	PA 2	PA 3	PA 4	PA 5
Mengenverhältnis der Komponenten Träger/ CDI/Acylase	5/2/1	5/4/2	5/8/4	5/4/2	5/4/2
Ausbeute (mg)	13,3	18,5	41,2	25,3	28,2
(%) a)	22	27	46	36	40
Eiweißgehalt (Gew.%)	17,0	19,6	31,7	-	27,7
Aktivität (U/mg Konjugat)	0,52	0,57	0,92	0,75	4,59
rel. Aktivität (%)	11,8	11,2	11,2	-	42,7
verwendetes Gel	S-200	S-200	S-200	G-150	G-150

a) Die Summe aus Polymer- und Enzymeinwaage bei der Reaktion entspricht 100 %.

In Tabelle 23 sind die dargestellten acylasehaltigen Konjugate aufgeführt. Die Konjugate PA 1 - PA 3 wurden nach der Elution aus der Gelsäule durch eine Ultrafiltration entsalzt und lyophilisiert. Die getrockneten Konjugate waren nur sehr langsam oder nur noch teilweise in Wasser löslich. Daher wurde das Konjugat PA 4 als Wiederholung von PA 2 nicht entsalzt, sondern die Produktfraktion des Eluates wurde auf ein bekanntes Volumen aufgefüllt. Ein Teil davon wurde entsalzt, um den Konjugatgehalt zu bestimmen.

Die Kupplungsreaktion des Konjugates PA 5 erfolgte in Gegenwart von Cobaltionen, welche als sogenannte "Effektoren" auch der Substratlösung zugesetzt werden (118). Auch PA 5 wurde als Lösung in dem verwendeten Elutionspuffer aufbewahrt.

2.2.10.3 Eigenschaften der (Träger 1/Aminoacylase)-Konjugate

Der Eiweißgehalt der Konjugate PA 1 - PA 5 wurde über die 2. Ableitung des Peaks der aromatischen Aminosäuren in dem UV-Spektrum der Acylase bestimmt, wie es ausführlich für die trypsinhaltigen Konjugate beschrieben worden ist (Kapitel 2.2.1.4.1). Die Ergebnisse können der Tabelle 23 entnommen werden.

Der Enzymgehalt von PA 4 ist nicht in die Tabelle aufgenommen worden, da er erst bestimmt worden ist, nachdem in der Lösung dieses Konjugates unlösliche Flocken entstanden waren, möglicherweise durch einen Pilzbefall. Auffallend ist der relativ hohe Eiweißgehalt von PA 5 verglichen mit PA 1.

Die enzymatische Aktivität der Aminoacylase wurde mit N-Acetyl-DL-methionin als Substrat bestimmt. Dabei wurde nur das L-Enantiomer zum L-Methionin hydrolysiert, das D-Enantiomer blieb unverändert. Da hier optisch aktive Substanzen umgesetzt wurden, bot sich als Methode für die kontinuierliche Messung der Aktivität der Aminoacylase die Polarimetrie an. Die Messung wurde im Durchflußverfahren mit nur mäßigen Pumpengeschwindigkeiten durchgeführt.

Während sich die Drehwerte zu Beginn der Reaktion in dem Racemat aufheben, findet man für einen quantitativen Umsatz die Summe der Drehwerte von L-Produkt und D-Substrat. Hierbei ist besonders günstig, daß die Drehwerte beider Substanzen das gleiche Vorzeichen aufweisen.

Tabelle 24 (Nach Lit. 121)

Molekulare Drehwerte für Substrat und Produkt bei der Aktivitätsbestimmung von Aminocylase

$$[M_{L-P}]_{365}^{37} = - 21,0 \text{ grad} \cdot \text{L/mol} \cdot \text{m}$$

$$[M_{D-S}]_{365}^{37} = - 64,5 \text{ grad} \cdot \text{L/mol} \cdot \text{m}$$

$$\text{für 100 \% Umsatz } [M_U]_{365}^{37} = - 85,5 \text{ grad} \cdot \text{L/mol} \cdot \text{m}$$

$[M]_{365}^{37}$: Molekulare Drehwerte, gemessen bei 37°C und 365 nm;
L-P : L-Produkt; D-S: Substrat

Die Abhängigkeit der Drehwerte von der Temperatur, der Wellenlänge und den Konzentrationen der verschiedenen, bei der Aktivitätsbestimmung auftretenden Substanzen ist von C. Wandrey (121) untersucht worden. C. Wandrey hat auch eine Tabelle ausgearbeitet, die es erlaubt, für verschiedene Substratkonzentrationen und aus den gemessenen Drehwerten den Umsatzgrad des Substrates abzulesen, um so die enzymatische Aktivität der Aminoacylase bestimmen zu können.

Zur Messung der Aktivität der Konjugate wurden diese in fester Form zu der Substratlösung gegeben, um Aktivitätsverluste, die schon während des AuflöSENS auftreten könnten, zu vermeiden.

Die relative Aktivität der getrockneten Konjugate PA 1 - PA 3 liegt bei 11 - 12 %, die von PA 4 dürfte aufgrund der höheren absoluten Aktivität, verglichen mit PA 1, etwas über der von PA 1 liegen. Sehr auffällig ist die hohe relative Aktivität von PA 5. Die Ursache dafür kann die Anwesenheit der Cobaltionen bei der Kupplungsreaktion sein, sowie die schonendere Behandlung des Konjugates, welches nicht wie PA 1 entsalzt und lyophilisiert worden ist. Die relativen Aktivitäten der Konjugate PA 1 - PA 5 sind ähnlich denjenigen der Immobilisate von B. Szajáni, bei denen die Aminoacylase mit dem gleichen Carbodiimid wie in der vorliegenden Arbeit an unlösliche, carboxylhaltige Polyacrylamide gebunden worden ist und die die besten Ergebnisse gezeigt haben (119).

Wie die Untersuchungen an trypsinhaltigen Konjugaten gezeigt hatten, führte die kovalente Bindung des Enzyms an die Polymeren zu einer verminderten Autolyse. Eine derartige erhöhte Stabilität gegenüber einer Proteolyse sollte auch bei anderen Enzymen feststellbar sein.

Tabelle 25

Vergleich der Lagerstabilität und der Proteolysebeständigkeit von nativer Aminoacylase und dem Konjugat PA 5

a) Lagerung bei pH 8, 22°C

	Restaktivität nach 4 Tagen	nach 6 Tagen
Acylase	81 %	80 %
PA 5	69 %	51 %

b) Lagerung bei pH 8, 22°C in Gegenwart von Chymotrypsin

	Restaktivität nach 4 Tagen	nach 6 Tagen
Acylase	-	0 %
PA 5	14 %	14 %

Dieses kann von Interesse sein, wenn Membranreaktoren durch proteolytisch wirksame Pilze oder Bakterien infiziert sind.

Für diese Untersuchung mit dem Konjugat PA 5 wurden gleiche Mengen an polymergebundener und nativer Acylase mit den gleichen Mengen an Chymotrypsin bei pH 8 und Raumtemperatur stengelassen. Unter den gleichen Bedingungen wurden Proben ohne Chymotrypsin gehalten. Es zeigte sich, daß das Konjugat PA 5 eine deutlich geringere Lagerstabilität als die native Acylase besaß, wohingegen die Beständigkeit gegenüber dem Angriff der Protease Chymotrypsin wesentlich verbessert war. Bei der Anwesenheit von Chymotrypsin zeigte PA 5 nach sechs Tagen noch eine restliche Aktivität von 14 % des Anfangswertes (Tabelle 25). Das native Enzym war unter diesen Bedingungen inaktiv.

Vermutlich war nur ein Teil der an Träger 1 gebundenen Aminoacylase für Chymotrypsin zugänglich und konnte inaktiviert werden. Der Rest der Acylase wurde nicht mehr angegriffen und blieb daher aktiv.

2.2.11 Konjugate aus Träger 4a und Aminoacylase

Träger 4a wurde auch für die kovalente Bindung von Aminoacylase eingesetzt. Dabei wurde so verfahren, wie es für die (Träger 4a/POD)-Konjugate beschrieben worden ist (Kapitel 2.2.6.1). Die Kupplungsreaktion fand bei einem schwach alkalischen pH-Wert statt und wurde durch eine leichte Gelbfärbung der Reaktionsmischung angezeigt. Die Reinigung des Konjugates wurde an Sephadex G-150 vorgenommen. Eine Probe des Eluates zeigte im Polarimeter mit N-Acetyl-DL-methionin keine Aktivität.

2.2.12 Konjugate aus Träger 7 und Aminoacylase

Wie es für Träger 4a und Aminoacylase beschrieben worden ist, wurde dieses Enzym auch an Träger 7 über eine Diazoniumkupplung gebunden. Die Reinigung des Konjugates erfolgte an Sephadex G-150. Von dem Eluat wurden Proben entnommen, um zu prüfen, ob enzymatische Aktivität vorhanden war. Es war wie bei dem Konjugat aus Träger 4a und Aminoacylase keine Aktivität feststellbar.

Da diejenigen der untersuchten Konjugate, in denen die Aminoacylase über eine Diazoniumgruppe gebunden war, keine enzymatische Aktivität zeigten, wurde von weiteren Kupplungsreaktionen an Polymere mit aromatischen Aminogruppen Abstand genommen.

Der Befund, daß die über Diazoniumgruppen gebundene Aminoacylase nicht mehr aktiv ist, stimmt mit den Ergebnissen von B. Szajáni (119) überein, der mit dieser Methode ebenfalls zumeist inaktive unlösliche Immobilisate erhielt.

3. Experimenteller Teil

Herkunft der verwendeten Substanzen:

N-Vinylpyrrolidon (NVP; Merck); Essigsäurevinylester (Ega); Acrylsäure-äthylester (Aldrich); N-Hydroxysuccinimid (Ega); Trypsin, E.C. 3.4.21.4 (Merck); Peroxidase, E.C. 1.11.1.7 (POD, Boehringer/Mannheim); Aminoacylase, E.C. 3.5.1.14 (Boehringer/Mannheim); Chymotrypsin, E.C. 3.4.21.1 (Boehringer/Mannheim); N^ω-Benzoyl-L-arginin-äthylester · HCl (BAEE, Merck); 2,2'-Azino-di-(3-äthylbenzthiazolin-6-sulfonat) (ABTS, Boehringer/Mannheim); Casein nach Hammarsten (Merck); Sephadex G-25, G-100, G-150, Sephacryl S-200 (Pharmacia); Dextranblau (Pharmacia); Acrylamid (Serva); Bismethylenacrylamid (Serva); Ampholine (LKB); Servalyt Precotes pH 3-10 (Serva); Coomassieblue (Serva); Ultrafiltrationsmembranen mit den Ausschlussgrenzen 10^4 D, $5 \cdot 10^4$ D, 10^5 D und $3 \cdot 10^5$ D (Berghof/Tübingen).

Geräte:

Absorptionsmessungen: Spectrophotometer 555, Perkin Elmer;
Lange Photometer LP 5 mit Anzeigeteil und W+W - Zweikanal-Schreiber 312
Titrationen: automatischer Titrierstand (Metrohm), bestehend aus
Dosimat E 535, Impulsomat E 473, pH-Meter E 500 sowie W+W - Zweikanalschreiber 312;
Optische Aktivität: Polarimeter 241, Perkin Elmer;
Elektrofokussierung: 2117 Multiphor und 2103 Power Supply, LKB;
Ultrafiltration: Ultrafiltrationszellen, Berghof/Tübingen.

3.1 Darstellung der reaktiven Polymeren

3.1.1 Darstellung von Träger 1

18,0 g Acrylsäure (0,25 mol) und 111,1 g N-Vinylpyrrolidon (1,0 mol) wurden in 300 ml Tetrahydrofuran mit 248 mg Dibenzoylperoxid (0,08 mol%) und 25,4 mg Cobaltnaphthenat für 3 h am Rückfluß erhitzt. Nach kurzer Zeit entstand eine Trübung des in THF unlöslichen Polymeren. Nach der Beendigung der Reaktion wurde abgesaugt, mit Aceton gewaschen und bei 40 - 50° C im Vakuum getrocknet. Ausb. 52,4 g (40,6 %). Das Rohprodukt wurde einen Tag lang in einer Soxhletapparatur mit Aceton extrahiert und anschließend wieder im Vakuum bei 40 - 50° C getrocknet. Ausbeute: 44,0 g (34,1 %).

Zur Elementaranalyse s. Kapitel 2.1.1.

3.1.2 Darstellung von Träger 2a

1,00 g Träger 1 wurden in 13 g DMF gelöst und 0,13 g N-Hydroxysuccinimid wurden zugegeben. 0,22 g Dicyclohexylcarbodiimid in 5 g DMF wurden in kleinen Portionen bei Raumtemperatur zum Ansatz gegeben. Es wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt und über Nacht bei 40° C stehen gelassen. Es wurde vom entstandenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Das Filtrat wurde im Vakuum eingeeengt, gekühlt und erneut angesaugt. Aus der DMF-Lösung wurde das Polymer mit dem dreifachen Volumen an Toluol ausgefällt, mit etwas Toluol gewaschen und im Vakuum getrocknet, Ausbeute: 0,93 g.

Die Elementaranalyse war aufgrund des geringen Gehaltes an Succinimidestergruppen nicht auswertbar.

3.1.3.1 Darstellung von Triäthylentetramin

Triäthylentetramin wurde aus 1,2-Dibromäthan und 1,2-Diaminoäthan nach den Angaben von J.v.Alphen (122) dargestellt.

3.1.3.2 Darstellung von Träger 2b

5,00 g Träger 1 wurden in 80 ml Wasser und 3,5 ml 2 N NaOH gelöst, 835 mg (5,38 mmol) CDI in 8 ml Wasser wurden dazu gegeben und eine halbe Stunde bei Raumtemperatur gerührt. 394 mg Triäthylentetramin (2,69 mmol) in 8 ml Wasser wurden zu dem Ansatz gegeben und mit 10 %iger HCl wurde auf pH 5,5 eingestellt. Die Mischung wurde drei Tage bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann durch eine Membranfiltration (Membranausschlußgrenze 50000 D, Filtrationsdruck 4,5 atm N₂) von niedermolekularen Bestandteilen gereinigt. Ausbeute: 4,75 g nach der Gefriertrocknung. Eine Dialyse erbrachte keine weitere Verminderung der Ausbeute.

Zur Elementaranalyse s. Kapitel 2.1.3.

3.1.4 Darstellung der Polymeren 3 - 5

Die Monomeren NVP und Vinylacetat und der Initiator Azo-bis-(isobuttersäurenitril) (AIBN) wurden entsprechend Tabelle 26 in einem Bombenrohr eingeschmolzen und 20 h bei 50°C und 1 h bei 100°C polymerisiert. Nach der Reaktion wurden im Falle der Acetate der Polymeren 3 und 4 die Polymeren mit Äthanol aus den Bombenrohren herausgelöst.

Tabelle 26

Polymerisationsansätze für die Acetate der Polymeren 3, 4 und 5

	Polymer 3 - Acetat	Polymer 4 - Acetat	Polymer 5 - Acetat
NVP 6g)	2,27 g (20,4 mmol)	2,24 g (20,2 mmol)	4,44 g (39,9 mmol)
Vinylacetat	1,72 g (20,0 mmol)	5,16 g (59,9 mmol)	1,72 g (20,0 mmol)
AIBN	33,2 mg	32,8 mg	10,1 mg
	0,5 mol%	0,25 mol%	0,1 mol%
Ausbeute	3,17 g	6,91 g	5,67 g
	79,4 %	93,4 %	92,0 %

Der Alkohol wurde im Vakuum abgezogen, das Polymer wurde in Wasser gequollen und erneut zur Trockne gebracht. Zur weiteren Entfernung des Alkohols und der Monomeren wurden die Produkte noch einmal mit Wasser behandelt, getrocknet, wieder gequollen und lyophilisiert. Polymer 5-Acetat wurde in Wasser gelöst, gegen Wasser dialysiert und ebenfalls lyophilisiert.

Zur Hydrolyse der Estergruppen wurden je Gramm Polymer 20 ml einer 0,2 N NaOH eingesetzt (bei Träger 4 - Acetat: 0,5 N NaOH). Die Lösungen wurden 3 - 4 h bei 65°C gerührt und mit 0,1 N HCl auf pH 7 gebracht. Die Neutralisation diente der Bestimmung der Menge an nicht umgesetzter NaOH und damit der Berechnung der Menge der hydrolysierten Estergruppen. Die Polymerlösungen wurden schließlich einer Ultrafiltration (Membranausschlußgrenze 50000 D, Filtrationsdruck 5 atm N₂) unterworfen und lyophilisiert.

Elementaranalysen:

Polymer 3-Acetat	59,77 % C	7,72 % H	8,13 % N
berechnet für 42 mol% Vinylacetat:			
	61,64 % C	7,76 % H	8,13 % N
Polymer 3	57,94 % C	7,92 % H	8,98 % N
Polymer 4-Acetat	57,94 % C	7,27 % H	3,98 % N
berechnet für 74 mol % Vinylacetat:			
	58,63 % C	7,38 % H	3,93 % N
Polymer 4	53,82 % C	8,08 % H	5,60 % N
Polymer 5-Acetat	59,10 % C	7,59 % H	8,90 % N
berechnet für 32 mol % Vinylacetat:			
	59,32 % C	8,02 % H	8,78 % N
Polymer 5	61,55 % C	8,37 % H	10,32 % N

3.1.5.1 Darstellung von 2-(3-Aminophenyl)-1,3-dioxolan

2-(3-Aminophenyl)-1,3-dioxolan wurde durch die Bildung des Acetals des m-Nitrobenzaldehyds mit Äthylenglykol und anschließende Reduktion der Nitrogruppe mit Hydrazin und Raney-Nickel zur Aminogruppe erhalten (55).

3.1.5.2 Darstellung der Träger 4a, 4b und 4c

Für Träger 4a wurden 0,4 g Polymer 4 in 16 ml Wasser gelöst, 0,4 ml konz. HCl und 20,3 mg 2-(3-Aminophenyl)-1,3-dioxolan wurden zugegeben. Nach einer vierstündigen Reaktion bei 50°C wurde der Träger in Aceton gefällt und in Wasser wieder gelöst. Da nicht die gesamte Substanz

löslich war, wurde durch ein feinmaschiges Netz von Gelanteilen abfiltriert. Die Polymerlösung wurde lyophilisiert. Für die Träger 4b bzw. 4c wurden 81,2 mg Dioxolan bzw. 161,4 mg Dioxolan eingesetzt.

Ausbeute Träger 4a : 0,40 g

Träger 4b : 0,46 g

Träger 4c : 0,43 g

Die Elementaranalysen waren wegen der ähnlichen Zusammensetzung der Edukte und des geringen Gehaltes an reaktiven Gruppen nicht auswertbar.

3.1.5.3 Darstellung des p-Nitrophenylesters von Träger 4a

Ca. 20 mg Träger 4a wurden in 3 ml trockenem DMF gelöst und mit ebensoviel p-Nitrophenol und Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Nach Stehen über Nacht wurde das Polymere aus der Lösung mit Aceton ausgefällt, so lange mit Äther gewaschen, bis nach dem Ausschütteln des Äthers mit Sodalösung in dieser keine Gelbfärbung mehr auftrat, und getrocknet.

3.1.6 Darstellung der Träger 5a, 5b und 5c

Polymer 5, Natriummethylat und p-Aminosalicylsäure-methylester wurden nach den Angaben der Tabelle 27 in 3 ml DMF gelöst und für 15 min auf 140°C erhitzt. Für weitere 2 Stunden wurde die Mischung bei einem Druck von 80 - 85 Torr auf ca. 110°C gehalten, verdampftes DMF wurde ergänzt. Dann wurde das Polymere durch Eingießen der Lösung in 100 ml Aceton gefällt und noch zweimal aus DMF in Aceton umgefällt. Die Polymeren wurden im Vakuum über P_2O_5 getrocknet.

Tabelle 27

Einwaagen für die Darstellung der Träger 5a, 5b und 5c

Produkt	Polymer 5	Na-Methylat	PAS-Ester
5a	0,5 g	5,64 mg / 0,10 mmol	111,0 mg / 0,66 mmol
5b	0,5 g	10,5 mg / 0,19 mmol	220,8 mg / 1,32 mmol
5c	0,5 g	20,7 mg / 0,38 mmol	441,0 mg / 2,64 mmol

Ausbeute: Träger 5a: 0,46 g

Träger 5b: 0,47 g

Träger 5c: 0,49 g

Für die Elementaranalysen gilt das unter 3.1.5.2 Gesagte.

3.1.7 Darstellung der Träger 6a, 6b und 6c

3.1.7.1 Copolymere aus NVP und Acrylsäureäthylester

Die Ausgangssubstanzen wurden entsprechend Tabelle 28 in Bombenrohre eingeschmolzen und drei Tage bei Raumtemperatur umgesetzt. Nach der

Tabelle 28

Ansätze für die Ausgangspolymeren für die Träger 6a, 6b und 6c

Ausgangssubstanz für	Polymer 6a	Polymer 6b	Polymer 6c
Einwaage NVP	4,50 g 40,49 mmol	4,75 g 42,75 mmol	4,88 g 43,88 mmol
Einwaage Acrylsäure- äthylester	0,45 g 4,49 mmol	0,23 g 2,25 mmol	0,11 g 1,13 mmol
Einwaage AIBN (0,4 mol%)	29,78 mg	29,84 mg	29,76 mg
n-Butanol	4 ml	4 ml	4 ml
Ausbeute	4,77 g	4,64 g	5,03 g

Reaktion wurden die Polymeren mit einem Wasser/Methanol-Gemisch bei 40 - 45°C gelöst und mehrere Tage gegen Wasser dialysiert. Anschließend wurden die Polymeren lyophilisiert

Elementaranalysen: Polymer 6a: 59,66 % C; 8,26 % H; 9,95 % N

Polymer 6b: 60,14 % C; 8,26 % H; 10,73 % N

Polymer 6c: 60,42 % C; 8,30 % H; 11,30 % N

3.1.7.2 Hydrazinolyse der acrylsäureesterhaltigen Polymeren

1,5 g der Polymeren wurden mit 30 ml 100 %igem Hydrazinhydrat für 24 h auf 100 - 110°C erhitzt, anschließend wurde das Hydrazin bei 75 - 80°C im Vakuum abdestilliert. Die Polymeren wurden in Wasser gelöst, von unlöslichen Bestandteilen wurde abzentrifugiert und der Überstand wurde gegen Wasser dialysiert. Die gereinigten Polymerlösungen wurden lyophilisiert.

Ausbeute: 6a: 1,31 g

6b: 1,50 g

6c: 1,52 g.

Elementaranalysen: Träger 6a: 58,19 % C; 7,67 % H; 12,87 % N

Träger 6b: 57,97 % C; 7,38 % H; 11,87 % N

Träger 6c: 59,84 % C; 7,87 % H; 11,79 % N

3.1.8 Darstellung von Träger 7

3.1.8.1 Darstellung von p-Nitrophenäthylbromid (123)

102 g (1 mol) Essigsäureanhydrid und 60 g (1 mol) Eisessig wurden gemischt und auf 0°C abgekühlt. 63,5 g (1 mol) rauchende Salpetersäure wurden unter Kühlung vorsichtig zugegeben. Die Mischung wurde auf unter -5°C abgekühlt und 92,5 g (0,5 mol) Phenäthylbromid wurden im Verlaufe von 2 h zugetropft. Der Ansatz wurde für weitere 2 h gerührt, während er sich auf Raumtemperatur erwärmte. Er wurde dann auf 1 kg Eis mit 133 g wasserfreiem Natriumcarbonat gegossen und der Niederschlag wurde abgesaugt. Nach der wäßrigen Phase erschien das ölige ortho-Isomer im Filtrat, das durch kräftiges Abpressen und anhaltendes Absaugen weitgehend entfernt werden konnte. Der Rückstand wurde aus Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 55,5 g (48 % d.Th.), Fp. 67° (Lit. 69 - 70°)

3.1.8.2 Darstellung von p-Nitrostyrol (124)

40,0 g (174 mmol) p-Nitrophenäthylbromid wurden in möglichst wenig warmen Äthanol gelöst. 20,4 g KOH (364 mmol), gelöst in möglichst wenig Methanol, wurden zu der Lösung gegeben. Nach kurzem Rühren wurde in eine gesättigte Kochsalzlösung eingegossen und mit Äther mehrmals extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgezogen. Zur Reinigung wurde das rohe p-Nitrostyrol auf eine kurze Kieselgelsäule (Volumen 100 ml, Radius 2 cm) gegeben und mit CCl_4 eluiert. Nach dem Abziehen des überwiegenden Teils des Lösungsmittels hinterblieb ein gelbes Öl, das nicht weiter gereinigt wurde.

Ausbeute: 23 g (89 % d.Th.)

3.1.8.3 Darstellung von Aluminium-Amalgam

Zur Darstellung von Al-Amalgam wurde verfahren, wie es H. Wislicenus und L. Kaufmann (125) beschrieben haben.

3.1.8.4 Darstellung von p-Aminostyrol (126)

Zu 13,6 g Al-Amalgam und 500 ml Äther in einem Kolben mit Rückflußkühler und Tropftrichter wurden 13 g p-Nitrostyrol (87 mmol) in 50 ml Äther in kleinen Portionen gegeben, während 9 ml Wasser langsam zugetropft wurden. Nach dem Nachlassen der Reaktion wurde 10 min am Rückfluß gekocht, vom Niederschlag abfiltriert, der Niederschlag mit Äther gewaschen, die Lösung getrocknet und der Äther abgezogen. Der Rückstand wurde einer Wasserdampfdestillation unterworfen. Ein Teil des Produktes kristallisierte aus dem Destillat in weißen Blättchen, der Rest wurde aus Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 4,8 g (40,2 mmol, 46 % d.Th.),

Fp. 18 - 20° (lit. 127: 20 - 22°)

3.1.8.5 Copolymerisation von NVP und p-Aminostyrol

4,06 g NVP (36,5 mmol) und 40,2 mg AIBN (0,6 mol% bezogen auf die gesamte Monomermenge) wurden in 5 ml Benzol unter Stickstoff eine halbe Stunde bei 70°C umgesetzt, dann wurden 0,51 g p-Aminostyrol (4,3 mmol) in 5 ml Benzol zugegeben. Für einen Tag wurde die Temperatur bei 75°C belassen. Nach dem Abdampfen des Benzols wurde das Polymer in Äthanol gelöst und aus Petroläther gefällt. Nach dem Entfernen des Petroläthers wurde das Produkt in Wasser gelöst (trübe gelbliche Lösung), gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert.

Ausbeute: 3,12 g (67,7 %)

Elementaranalyse: 56,82 % C; 7,37 % H; 10,65 % N

3.2 Umsetzung der reaktiven Polymeren mit Enzymen

3.2.1 Bindung von Trypsin an Träger 1

100 mg Träger 1 wurden in 0,3 ml 1 M NaHCO_3 -Lösung und in 0,7 ml Wasser gelöst, dann wurde die gewünschte Menge an CDI zusammen mit dem doppelten Volumen an 3 N HCl zugefügt. Nach einem halbstündigen Rühren bei Raumtemperatur wurde die erforderliche Menge an Trypsin, gelöst in 2,0 ml Phosphatpuffer (pH 5,85, 0,025 M), zugegeben. Der Ansatz wurde eine weitere halbe Stunde bei Raumtemperatur gerührt und schließlich bei 4°C gelagert.

Zur Isolierung der Konjugate erfolgte eine Fällung mit kleinen Portionen von feingemörsertem Ammoniumsulfat. Erste Trübungen traten auf, wenn die Lösung ca. 2 M an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ war. Die Fällung war vollständig, wenn eine 3,0 - 3,2 M Lösung vorlag. Der Überstand wurde vom klebrigen Niederschlag abgossen. Nach dem schnellen Spülen des Niederschlages mit wenig Wasser, wurde dieser in ungefähr 40 ml Wasser gelöst und einer Membranfiltration unterworfen (Ausschlußgrenze der Membran: 50000 D, Filtrationsdruck 5 atm N_2). Es wurde filtriert, bis im Filtrat mit BaCl_2/HCl kein Sulfat nachweisbar war. Der Rückstand der Filtration, die Konjugatlösung, wurde lyophilisiert.

3.2.2 Bindung von Trypsin an Träger 2a

25 mg Träger 2a wurden in 1,0 ml Phosphatpuffer (pH 7,5; 0,025 m) und 2 Tropfen 1 m NaHCO_3 -Lösung gelöst. Die erforderliche Menge an Trypsin wurde ebenfalls in 1 ml des Phosphatpuffers gelöst. Nach dem Zusammengeben beider Lösungen wurde mit 1 m NaHCO_3 -Lösung auf pH 7,5 eingestellt. Nach dem Ablauf der Reaktionszeit wurde mit 1 ml des nachfolgend verwendeten Elutionspuffers verdünnt und auf eine Sephadex G-100-Säule aufgetragen (Elutionspuffer: 0,01 m K_2HPO_4 /0,01 m KH_2PO_4 /0,5 m NaCl; Säule: 200 ml bei 1,3 cm Radius). Die Durchflußgeschwindigkeiten lagen bei 13 - 17 ml/h. Die Elution wurde optisch bei 254 nm in einer 1 mm - Durchflußküvette und mit einem angeschlossenen Schreiber verfolgt. Das Ende der ersten Fraktion, der Produktfraktion, wurde willkürlich in den Bereich gelegt, in dem die Extinktion des Eluates nur noch ungefähr die Hälfte der maximalen Extinktion zeigte. Die Produktfraktion wurde durch eine Membranfiltration entsalzt (s. Kapitel 3.2.1) bis im Filtrat mit $\text{AgNO}_3/\text{HNO}_3$ kein Chlorid nachweisbar war. Der Filtrationsrückstand wurde lyophilisiert.

3.2.3 Bindung von Trypsin an Träger 2b

Je 25 mg Träger 2b wurden in 0,5 ml Phosphatpuffer (pH 5,85; 0,025 m) gelöst, dazu wurde 3 N HCl gegeben, je mg an CDI 2,5 μl . Schließlich wurden die erforderlichen Mengen an CDI und Trypsin, letzteres in 1 ml Phosphatpuffer (s.o.) gelöst, zugefügt. Der pH-Wert der Mischung, der bei 5,5 - 5,6 lag, wurde nicht verändert. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurden die Ansätze auf eine Sephadex G-100-Säule (s. Kapitel 3.2.2) aufgetragen und mit einem Acetatpuffer (0,02 m Acetat, 0,5 m NaCl, pH 4,5) eluiert. Die Produktfraktion wurde durch eine Ultrafiltration entsalzt (s. Kapitel 3.2.2) und lyophilisiert.

3.2.4 Bindung von Trypsin an die Träger 6a, 6b und 6c

50 mg des jeweiligen Trägers wurden in 3 ml Phosphatpuffer (0,1 m, pH 5,6) gelöst, die gewünschte Menge an Trypsin (Tabelle 17, Kapitel 2.2.4), gelöst in 1 ml des Phosphatpuffers, und CDI, ebenfalls in 1 ml des Puffers gelöst, wurden zugegeben. Mit 1 ml des Puffers wurde ver-

dünnt. Nach der Zugabe von ebensoviel 3 m HCl wie CDI zugefügt wurde, ergab sich ein pH-Wert von ca. 6. Es wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt, 20 h bei 4°C stehen gelassen und wieder 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Konjugate wurden teils mit festem Ammoniumsulfat, teils mit einer gesättigten Lösung desselben gefällt. Die Endkonzentration des Salzes lag in allen Fällen bei 1,7 m. Durch eine Membranfiltration (Membranausschlußgrenze 100000 D, Filtrationsdruck 2 atm N₂) wurde entsalzt, bis im Filtrat kein Sulfat nachweisbar war.

3.2.5 Bindung von POD an Träger 1

50 mg Träger 1 wurden in 0,2 ml 1 m NaHCO₃-Lösung und 0,3 ml Wasser gelöst. CDI und Salzsäure wurden zugefügt, wie es bei den entsprechenden trypsinhaltigen Konjugaten beschrieben wurde. POD wurde in 1 ml Phosphatpuffer (pH 5,85; 0,025 m) gelöst und zugegeben und der gewünschte pH-Wert wurde eingestellt. Die Kupplungsreaktion fand bei 4°C statt. Die Isolierung der Konjugate erfolgte durch Auftragen des Ansatzes auf eine Sephadex G-100 - Säule (200 ml, Radius 1,3 cm) und durch Elution mit einem Phosphatpuffer (0,01 m KH₂PO₄, 0,01 m K₂HPO₄, 0,02 m NaCl, ab PP 8: 0,5 m NaCl) bei Raumtemperatur. Zur Geschwindigkeit und Kontrolle der Elution s. Kapitel 3.2.2. In einzelnen Fällen wurde die erste Fraktion schon kurz nach dem Peakmaximum abgebrochen, um eine zweite Fraktion für vergleichende Untersuchungen zu gewinnen (PP 2 und PP 3). Die Produktfraktionen wurden entsalzt (Membranausschlußgrenze 50000 D, Filtrationsdruck 5 atm N₂) bis kein Chlorid im Filtrat nachweisbar war und lyophilisiert.

3.2.6 Bindung von POD an Träger 4a

40 mg Träger 4a wurden in 3 ml Wasser gelöst, 100 µl 3 m HCl wurden zugegeben und die Mischung wurde im Eisbad abgekühlt. Mit 50 µl 1 m KNO₂-Lösung wurde eine halbe Stunde diazotiert. Überschüssiges Nitrit wurde durch etwas Ammoniumsulfamat zerstört und mit 500 µl 1 m NaHCO₃-Lösung wurde schwach alkalisch gemacht. Nach der Zugabe von 5,0 mg fester POD wurde 45 min im Eisbad gerührt. Dann wurde ein Überschuß von wäßriger Natrium-salicylat-Lösung zugefügt und über Nacht bei 4°C

stehen gelassen. Nach dem Abfiltrieren von kleinen Mengen unlöslicher Substanz wurde der Ansatz durch eine Gelchromatographie an Sephadex G-100 fraktioniert wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben. Die Produktfraktion wurde mit Elutionspuffer auf 25 ml aufgefüllt. 10 ml der Lösung wurden mittels einer Membranfiltration (s. Kapitel 3.2.5) entsalzt, um den Konjugatgehalt bestimmen zu können.

3.2.7 Bindung von POD an die Träger 5a, 5b und 5c

In 2 ml Wasser wurden 40 mg Träger 5a (oder 5b/5c) gelöst. Nach der Zugabe von 100 μ l 3 m HCl wurde in einem Eisbad gekühlt und 50 μ l 1 m KNO_2 -Lösung wurden zugegeben. Nach einer halben Stunde Reaktion wurde überschüssiges Nitrit mit Ammoniumsulfamat zerstört und 5,0 mg feste POD wurden zugefügt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C stehen gelassen, mit 2 ml des später verwendeten Elutionspuffers verdünnt und auf einer Sephadex G-100 - Säule fraktioniert (s. Kapitel 3.2.2). Mit der Produktfraktion wurde verfahren wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben.

3.2.8 Bindung von POD an Träger 7

40 mg Träger 7 wurden in 2 ml Wasser und 0,1 ml 3 m HCl gelöst und im Eisbad gekühlt. Nach der Zugabe von 50 μ l 1 m KNO_2 -Lösung wurde eine halbe Stunde diazotiert und überschüssiges Nitrit mit Ammoniumsulfamat zerstört. Nach dem Einstellen eines schwach alkalischen pH-Wertes mit 1 m NaHCO_3 -Lösung und der Zugabe von fester POD (s. Tabelle 22, Kapitel 2.2.9), reagierte der Ansatz bei 4°C über Nacht. Die Isolierung der Konjugate erfolgte, wie es in dem Abschnitt 3.2.2 beschrieben wurde.

3.2.9 Bindung von Aminoacylase an Träger 1

50 mg Träger 1 wurden in 0,2 ml 1 m NaHCO_3 und 0,3 ml Wasser gelöst, CDI - entsprechend den Angaben in Tabelle 23 - und HCl (35 mg je 20 mg CDI) wurden zugegeben, und die Mischung wurde eine halbe Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Eine Acylase-Aufschwemmung in 3,2 m Ammoniumsulfat mit 10 mg Enzym/ml wurde vor der Verwendung zentrifugiert. Bis

auf einen Rest von 0,5 ml wurde der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 1 ml Phosphatpuffer (0,025 m, pH 5,85) gelöst und zur Polymer/CDI-Mischung gegeben. Der Ansatz reagierte nach dem Einstellen auf pH 6 zwei Tage und wurde dann auf einer Gelsäule fraktioniert. Dafür wurden Sephacryl S-200 (PA 1, PA 2 und PA 3) (Säulenlänge 37 cm, Radius 1,3 cm) und Sephadex G-150 (PA 4 und PA 5) (Säulenlänge 57 cm, Radius 1,3 cm) eingesetzt. Zur Elution s. Kapitel 3.2.2.

3.2.10 Bindung von Aminoacylase an Träger 4a

30 mg Träger 4a, gelöst in 3 ml Wasser, wurden im Eisbad mit 100 μ l 3 m HCl und 50 μ l 1 m KNO_2 versetzt. Nach einer halben Stunde wurden Ammoniumsulfamat und 500 μ l 1 m NaHCO_3 zugesetzt. 1 ml Acylase-Aufschwämmung wurden zentrifugiert, der Überstand wurde abgegossen und der Rückstand wurde in 0,5 ml Elutionspuffer gelöst (s. Kapitel 3.2.2). Nach der Zugabe der Enzymlösung zur Polymerlösung wurde eine halbe Stunde gerührt, mit überschüssiger Na-Salicylatlösung versetzt und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Nach dem Abfiltrieren von kleinen Mengen unlöslicher Substanz wurde der Ansatz auf eine Sephadex G-150 Säule (Länge 57 cm, Radius 1,3 cm) aufgetragen und fraktioniert. Die Produktfraktion wurde mit Elutionspuffer auf ein bekanntes Volumen aufgefüllt und so aufbewahrt.

3.2.11 Bindung von Aminoacylase an Träger 7

40 mg Träger 7 wurden in 2 ml Wasser und 0,1 ml 1 m HCl gelöst. Die Diazotierung und Bindung des Enzyms erfolgten, wie es für Träger 4a und Aminoacylase beschrieben worden ist, ein Zusatz von Na-salicylat war hier nicht erforderlich.

3.3 Charakterisierung der polymergebundenen Enzyme

3.3.1 Reinheitskontrolle

Zur Prüfung auf die Abwesenheit von ungebundenem Enzym wurden die Konjugate mit Hilfe der Elektrofokussierung untersucht. Dabei wurden teils selbst gefertigte Gelplatten und teils käufliche Fertiggelefolien verwendet.

Die selbst hergestellten Gele wurden nach den Angaben der Firma LKB polymerisiert (128). Die 2 mm dicken Gele enthielten 5 % Polyacrylamid mit einem Vernetzungsgrad von 3 %. Der pH-Bereich der Gele reichte von pH 3,5 bis pH 9,5. Zur Entwicklung der Gele wurde mit Geräten der Firma LKB nach deren Angaben verfahren. Nach der Entwicklung wurden die eiweißhaltigen Substanzen mit Trichloressigsäure ausgefällt und mit Coomassie Blue R 250 bzw. einem gleichwertigen Farbstoff angefärbt.

Aufgrund der nur mäßigen Stabilität der dicken Gele und der langen Färbe- und Entfärbezeiten wurden später wesentlich dünnere Fertiggele, die auf einer Kunststoffolie fixiert waren, eingesetzt. Diese wurden von der Firma Serva (Heidelberg) bezogen. Der pH-Bereich lag bei 3-10. Der Polyacrylamidgehalt und der Vernetzungsgrad waren die gleichen, wie für die selbstgefertigten Gele angegeben wurde. Die Entwicklung und Färbung der Gele erfolgten ebenfalls wie oben angegeben.

Die Einwaagen der Konjugate betrugen 0,5 - 0,8 mg, die in 6 - 7 µl Wasser gelöst bzw. teilweise auch nur gequollen aufgetragen wurden. Zum Vergleich wurden 0,1 - 0,2 mg der freien Enzyme auf die Gele gegeben.

3.3.2 Bestimmung des Eiweißgehaltes der trypsinhaltigen Konjugate

Zur Bestimmung des Eiweißgehaltes der trypsinhaltigen Konjugate wurde, wie in Kapitel 2.2.1.4.1 beschrieben, die Derivativspektroskopie eingesetzt (Perkin-Elmer UV-VIS-Spektrometer 555). Für die Eichkurven der verwendeten Trypsinchargen betrug die Enzymkonzentration im Test ca. 0,015 - 0,5 mg/ml. Die Ableitungsspektren im Bereich 320 - 260 nm wurden mehrmals bei verschiedenen Schreiberspreizungen aber konstanter Schreibergeschwindigkeit und -dämpfung aufgenommen, um das "Rauschen" des

Photometers zumindest teilweise zu eliminieren. Zur Auswertung wurden die Produkte aus den Signalhöhen und den Schreiberbereichen gebildet, deren Mittelwert den Meßwert für die jeweilige Trypsinkonzentration ergab. Aus den Meßwerten wurde rechnerisch eine Ausgleichsgerade erhalten (Rechner HP 97, Ausgleichskurvenprogramm), aus der die Eiweißgehalte der Konjugate, deren Meßwerte ebenso wie des freien Trypsins erhalten worden sind, berechnet wurden.

3.3.3 Bestimmung des Eiweißgehaltes der POD-haltigen Konjugate

Zur Bestimmung des Enzymgehaltes der (Träger I/POD)-Konjugate wurde das Maximum der Soret - Bande bei ca. 400 nm herangezogen. Eine Eichgerade wurde mit der verwendeten POD angefertigt. Da einige Konjugate in ihrer Lösung eine leichte Trübung verursachten, wurde zur Auswertung nicht die absolute Extinktion der Soret - Bande herangezogen, sondern die Extinktionsdifferenz der Wellenlängen 400 nm und 500 nm. Für die Eichgerade lag die POD-Konzentration bei 0,1 - 0,5 mg/ml.

3.3.4 Bestimmung des Eiweißgehaltes der Konjugate mit Aminoacylase

Die Bestimmung des Acylasegehaltes wurde mittels der zweiten Ableitung des UV-Spektrums im Bereich 320 - 260 nm durchgeführt, wie es unter 3.3.2 beschrieben ist.

3.3.5 Bestimmung der enzymatischen Aktivität von trypsinhaltigen Konjugaten

3.3.5.1 Titrimetrische Bestimmung der Aktivität

Die Konjugate wurden genau eingewogen und in Wasser gelöst. Im allgemeinen wurden 100 µl dieser Lösungen mit ca. 0,2 - 1,0 mg Konjugat, je nach der zu erwartenden Aktivität, zur Substratlösung gegeben. Deren Volumen war 20 ml mit 0,01 M BAEE, 0,01 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) und 0,1 M NaCl. Für die Standardmessungen lagen der pH-Wert bei 8,5 und die Temperatur bei 25°C. Unter den gleichen Bedingungen wurde auch die

Eigenhydrolyse von BAEE ab pH 8 bestimmt, um bei der Berechnung der Aktivität berücksichtigt zu werden. Bei der Bestimmung der pH-Abhängigkeit der Aktivität wurden entsprechend eingestellte Tris-Puffer verwendet.

3.3.5.2 Optische Bestimmung der Aktivität

Die Konjugatlösungen hatten die gleichen Konzentrationen wie bei dem titrimetrischen Verfahren. Als Substrat dienten 10 ml einer Lösung mit 0,01 m BAEE, 0,1 m Tris und 0,2 m NaCl. Die Standardmessungen wurden ebenfalls bei pH 8,5 und 25°C durchgeführt. Die Lösung wurde mit einer peristaltischen Pumpe im Umlaufverfahren durch eine 1 mm - Durchflußküvette gepumpt. Die Messung wurde bei 255 nm durchgeführt ($\epsilon = 0,808 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ (129)). Vor der Zugabe des freien Trypsins bzw. der Konjugate wurde jeweils die Summe aus der Substrateigenhydrolyse und der Aktivität von eventuellen Kontaminationen der Schläuche und der Küvette mit enzymatisch aktiven Substanzen bestimmt, um die Konjugataktivität bzw. Enzymaktivität berechnen zu können. Mit entsprechend eingestellten Pufferlösungen wurde auch die pH-Abhängigkeit der Aktivität gemessen.

Für die Messung der Thermostabilität der Konjugate wurden die entsprechenden Konjugate unter Schütteln schnell temperiert. Die zu bestimmten Zeiten entnommenen Proben wurden im Eisbad abgekühlt und dort bis zur Messung der Aktivität nach den beschriebenen Verfahren aufbewahrt.

3.3.5.3 Bestimmung der Aktivität bei dem Betrieb von Enzymreaktoren

3.3.5.3.1 Batch-Verfahren

In eine auf 25°C temperierte Ultrafiltrationszelle mit einer Membran der gewünschten Ausschußgrenze wurden die Substratlösung (s. "titrimetrische Aktivitätsbestimmung") und die enzymhaltige Lösung gegeben. Die Aktivität wurde nach dem titrimetrischen Verfahren unter Verwendung einer Einstabmeßkette bestimmt. Nach jeder Messung wurde die Substratlösung mit einem Druck von 5 atm N_2 (bei Membranen mit MWCO bis 50000 D) bzw. 2 atm N_2 (bei Membranen mit MWCO ab 100000 D) abfiltriert. Der

Rückstand wurde erneut mit Substratlösung zur Bestimmung der verbliebenen Aktivität versetzt.

3.3.5.3.2 Kontinuierliches Verfahren

Aus einem Vorratsgefäß wurde mittels eines leichten Stickstoffüberdruckes bei 22°C die Substratlösung (2,5 mmol BAEE, 0,05 m Tris pH 8, 0,1 m NaCl) in eine gerührte Ultrafiltrationszelle mit einer Membran des MWCO 100000 D/Durchmesser 46 mm gepumpt. Die Durchflußgeschwindigkeit wurde über den Druck auf 80 - 100 ml eingestellt. Die Extinktion des Filtrates wurde bei 255 nm in einer 1 mm-Durchflußküvette gemessen. Aus den Differenzen der Extinktion der Substratlösung und des kontinuierlich anfallenden Filtrates konnte ungefähr der Umsatzgrad des Substrates bestimmt werden. Für die maximale gemessene Extinktionsdifferenz $\Delta E = 0,2$ konnte nach der Lambert-Beer-Gleichung mit $\epsilon = 0,808 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ für N^α -Benzoylarginin bei 255 nm und einer Schichtdicke von 0,1 cm eine Produktkonzentration von 2,5 mmol/l berechnet werden, welche gleich der eingesetzten Substratkonzentration war, d.h. einem vollständigen Umsatz entsprach.

3.3.5.4 Titrimetrische Bestimmung der Aktivität mit Casein als Substrat

Die Casein-Lösung wurde bereitet durch Auflösen von 2,0 g Casein (nach Hammarsten) in 30 ml Wasser und 0,6 ml 2 N NaOH und Auffüllen auf 100 ml. Für die Aktivitätsbestimmung wurden 19 ml Casein-Lösung und 1,0 ml Pufferlösung (0,2 m Tris pH 8,5; 2,0 m NaCl) gemischt und 0,1 ml Konjugatlösung zugegeben. Die entstehenden Carboxylgruppen wurden bei pH 8 und 25°C unter Stickstoff mit 0,05 N NaOH titriert.

3.3.6 Untersuchung der Thermostabilität trypsinhaltiger Konjugate

Für die Untersuchung der Thermostabilität der Konjugate wurden ihre frischen Lösungen unter Schütteln schnell temperiert. Die zu bestimmten Zeiten entnommenen Proben wurden im Eisbad abgekühlt und dort bis zur Messung der Aktivität nach den unter Kapitel 3.3.4.1 bzw. 3.3.4.2 beschriebenen Verfahren aufbewahrt.

Die Einwaagen betrugen für die Untersuchung der Thermostabilität von Trypsin in Wasser 1,0 mg/ml, für PT 19 in Wasser 2,3 mg/ml und für die Messungen in Acetatpuffer (pH 4,9; 1 mol/l) bei allen Proben 1,8 mg/ml.

3.3.7 Bestimmung der enzymatischen Aktivität von POD-haltigen Konjugaten (modifizierte Methode nach W. Werner et al. (107) mit ABTS als Wasserstoffdonator)

In einer 1 cm - Photometerküvette wurden 3 ml einer 5 mmol Lösung von ABTS in Phosphatpuffer (0,025 m, pH 7) mit 0,1 ml einer 0,03 %igen H_2O_2 -Lösung versetzt (E_{240} : ca. 0,40). 0,1 ml einer Lösung der Konjugate wurden zugesetzt. Nach dem möglichst schnellen Vermischen der Lösungen wurde bei 25°C die Extinktionsänderung bei 436 nm (ϵ : $29,3 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$) verfolgt.

Für die Untersuchung der Beständigkeit der Konjugate gegen H_2O_2 wurde bei sonst gleichen Bedingungen eine 2 mmol ABTS-Lösung verwendet.

3.3.8 Untersuchung der Thermostabilität POD-haltiger Konjugate

Für die Untersuchung wurde wie unter 3.3.6 verfahren. Die Einwaagen betrugen für native POD 42 $\mu\text{g/ml}$, für PP 2 1,23 mg/ml, für PP 4 1,97 mg/ml und für PP 8 0,89 mg/ml.

3.3.9 Bestimmung der enzymatischen Aktivität von acylasehaltigen Konjugaten

10 ml einer 0,4 m Lösung von N-Acetyl-DL-methionin mit einer Konzentration von 0,2 m an L-Substrat und pH 7 und 0,1 ml von 0,05 m CoCl_2 (Endkonzentration in Test: $5 \cdot 10^{-4}$ m) wurden im Umlaufverfahren durch eine 1 ml-Durchflußküvette in einem Polarimeter (Perkin-Elmer-Polarimeter 241) gepumpt. Die Konjugate wurden teils in fester Form, teils in Lösung zugegeben. Die zeitliche Änderung des Drehwertes der Lösung bei 37°C und 365 nm wurde über einen Schreiber aufgezeichnet.

3.3.10 Bestimmung der Lager- und Proteolysebeständigkeit von Acylase und acylasehaltigen Konjugaten

Zur Bestimmung der Lager- und der Proteolysestabilität wurden $0,5 \text{ cm}^3$ Aminoacylase in $3,2 \text{ M } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in $4,5 \text{ cm}^3$ Wasser und $5,0 \text{ cm}^3$ Phosphatpuffer ($0,1 \text{ M}$, pH 8) gelöst. Mit 2 M NaOH wurde auf pH 8 eingestellt. Endkonzentrationen: $0,5 \text{ mg Aminoacylase/cm}^3$ und $0,114 \text{ mg Chymotrypsin/cm}^3$.

Die Lösung von PA 5 wurde mit 2 M NaOH auf pH 8 eingestellt. Der Konjugatgehalt betrug $1,878 \text{ mg/cm}^3$ mit $27,7 \%$ Enzym entsprechend $0,520 \text{ mg Enzym/cm}^3$. Die übrigen Konzentrationen betrugen für Chymotrypsin $0,116 \text{ mg/cm}^3$, für Natriumazid (gegen Pilzbefall) $0,226 \text{ mg/cm}^3$. Die Azidkonzentration wurde nach vier Tagen auf $0,341 \text{ mg/cm}^3$ erhöht.

3.3.11 Messungen mit der Ultrazentrifuge

Alle Untersuchungen wurden mit einer analytischen Ultrazentrifuge Modell E der Firma Beckman Instruments durchgeführt. Als optisches System stand eine Schlierenoptik zur Verfügung. Die Versuchstemperatur betrug $(298,1 \pm 0,2) \text{ K}$. Bei folgenden Frequenzen und in folgenden Zellen wurden die Versuche durchgeführt:

Sedimentationsgeschwindigkeit bei 60000 min^{-1} in einer Single Sector Zelle mit Aluminiummittelstück,

Diffusionsgeschwindigkeit bei 11000 min^{-1} in einer Capillartyp Single Sector Zelle aus Kel F und

Sedimentations-Diffusions-Gleichgewicht bei 15000 min^{-1} in einer Doppelsektorzelle aus Kel F.

Die trypsinhaltigen Konjugate wurden in $0,025 \text{ m KH}_2\text{PO}_4$ gelöst, natives Trypsin wurde in 1 mmol HCl gelöst. Polymer 4-Acetat wurde in Äthanol/Wasser ($50/50$, v/v) und die übrigen Polymeren wurden in $0,025 \text{ m Phosphat pH 7}$ gelöst.

Die Schlierenbilder wurden auf "Kodak metallographic plates" aufgenommen. Zur Belichtung der Platten diente eine Quecksilberhochdrucklampe. Die Schlierenaufnahmen wurden nach 12-facher Vergrößerung ausgewertet.

Die Dichten der Lösungen wurden bei $(25 \pm 0,01)^{\circ}\text{C}$ mit der Meßeinrichtung DMA 02 C der Firma Virus KG bestimmt. Dieses Gerät erlaubt, die Dichtemessung bei einem Präparatevolumen von $0,6 \text{ cm}^3$ unter Luftabschluß mit einer Genauigkeit von 10^{-6} g/cm^3 durchzuführen.

Als Ergänzung zu Kapitel 2.2.1.4.7 (Bestimmung der Molmassen von (Träger 1/Trypsin)-Konjugaten mit Hilfe der Ultrazentrifuge) sollen hier die Ableitungen der Gleichungen gebracht werden, die für die Auswertung der photographischen Aufnahmen, die während des Zentrifugenlaufes gemacht worden sind, notwendig sind.

Wie in Kapitel 2.2.1.4.7 erwähnt, wird die zu untersuchende Substanz einem Zentrifugalfeld ausgesetzt. Die Teilchen der Substanz lassen sich um so leichter trennen, je größer der Massenunterschied, die Zentrifugalkraft und die Unterschiede der Dichten von Sedimentierendem (gilt natürlich streng nur für grobdisperse Teilchen, s. auch Gleichung 3) und Einbettungsmedium sind. Die Kraft, mit der ein Teilchen sedimentiert wird, ist

$$(1) \quad K_s = \omega^2 r \cdot V \cdot (\rho_G - \rho_L), \text{ mit } \omega : \text{Winkelgeschwindigkeit}$$

$V : \text{Volumen der Teilchen}$

$r : \text{Abstand vom Rotationszentrum}$

$\rho_G, \rho_L : \text{Dichten von Gelöstem und Lösungsmittel}$

Der Sedimentationskraft wirkt die Reibungskraft der Sedimentation

$$K_R = f \frac{dr}{dt} \quad \text{entgegen, } f \text{ ist der Reibungskoeffizient.}$$

Im stationären Zustand sind beide Kräfte gleich groß:

$$(2) \quad \omega^2 r \cdot V \cdot (\rho_G - \rho_L) = f \cdot \frac{dr}{dt}$$

Der linke Term kann mit ρ_G erweitert werden. Mit dem Molgewicht des Gelösten $M_G = V \rho_G$ und dem partiellen spezifischen Volumen

$$(3) \quad v_G^* = \frac{1}{\rho_G} \quad \text{erhält man Gleichung 4. (Bei molekulardispersen Systemen tritt an die Stelle der Dichte der gelösten Teilchen, die hier ihren Sinn verliert, der reziproke Wert des partiellen spezifischen Volumens.):}$$

$$(4) \quad \omega^2 r \cdot M_G (1 - v_G^* \rho_L) = f \cdot \frac{dr}{dt} \quad \text{oder umgeformt}$$

$$(5) \quad M_G = \frac{1}{(1 - v_G^* \rho_L)} \cdot f \cdot \frac{dr/dt}{\omega^2 r}$$

Der Ausdruck $\frac{dr/dt}{\omega^2 r}$ wird als Sedimentationskonstante s bezeichnet. Der Reibungskoeffizient der Sedimentation kann dem Reibungskoeffizienten der Diffusion gleichgesetzt werden, vorausgesetzt, sie sind gleich groß. Umfangreiche experimentelle Daten erlauben die Gleichsetzung. Damit gilt $f = \frac{RT}{D}$, mit D = Diffusionskoeffizient. Eingesetzt in Gleichung (5) erhält man

$$(6) \quad M_G = \frac{RT}{(1 - v_G^* \rho_L)} \cdot \frac{s}{D}$$

Diese schon von T. Svedberg (87) abgeleitete Formel ist unabhängig von irgendwelchen Annahmen über die Molekülstruktur. Für die Ableitung wurde vorausgesetzt, daß die Geschwindigkeit der Sedimentation stets sehr viel größer als die Geschwindigkeit der Rückdiffusion ist. Gleichung (6) gilt für gelöste Nichtelektrolyte. Sie kann auch als Näherung zur Bestimmung der Molmasse eines gelösten Polymerelektrolyten, wie er hier vorliegt, herangezogen werden, wenn zur Ausschaltung des Sedimentationspotentials ein niedermolekularer Fremdelektrolyt zugegeben wird.

Die Sedimentationsgeschwindigkeit wird in den gebräuchlichen analytischen Ultrazentrifugen in der Regel optisch verfolgt. Unter den verschiedenen Möglichkeiten haben sich die sogenannte Schlierenoptik und seit einigen Jahren besonders die Absorptionsoptik am stärksten durchgesetzt. Für die hier durchgeführten Messungen wurde mit der Schlierenoptik gearbeitet. Dabei wird durch eine geeignete optische Einrichtung die Wanderung der Teilchen durch die Messung der Ortsabhängigkeit des Brechungsindexgradienten dn/dr verfolgt. Dieser ist im üblicherweise angewendeten Konzentrationsbereich dem Konzentrationsgradienten dc/dr proportional. Damit entspricht ein Schlierendiagramm der ersten Ableitung der Kurve des Konzentrationsverlaufes in der Meßzelle. Zur Bestimmung der Sedimentationskonstanten s wird die Sedimentationsgeschwindigkeit verfolgt. Leicht zu beobachten ist das Maximum der Gradientenkurve $dn/dr = f(r)$. Dieses Maximum entspricht dem Punkt, an dem 50 % der Konzentration erreicht sind, die in der sogenannten Plateauregion, einem Bereich konstanter Konzentration vorliegt. Die Auswertung erfolgte unter Anwendung der Definitionsgleichung für die Sedimentationskonstante $s = \frac{dr/dt}{\omega^2 r}$.

Nach Umformung und unbestimmter Integration ergibt sich

$$(7) \quad \ln r = s \omega^2 t + c.$$

Bei der Auftragung von $\ln r$ über der Zeit t erhält man eine Gerade, deren Steigung $m = s\omega^2$ ist (s. Abb. 20). Bei bekannter Rotorfrequenz der Ultrazentrifuge läßt sich über $\omega = 2\pi\nu$ (ν : Frequenz in sec^{-1}) die Sedimentationskonstante s berechnen. Bei diesem s sind der Einfluß von Diffusion (thermodynamische Kopplung), Konzentration, Viskosität und anderen Faktoren nicht berücksichtigt, so daß man besser von einem scheinbaren Sedimentationskoeffizienten spricht. Bei höheren Konzentrationen an zu untersuchender Substanz ist es erforderlich, s bei verschiedenen Konzentrationen zu bestimmen, um eine Extrapolation auf die Konzentration $c = 0$ vornehmen zu können. In den vorliegenden Fällen war die molare Konzentration der Proben aber so gering, daß nur ein zu vernachlässigender Fehler zu erwarten war.

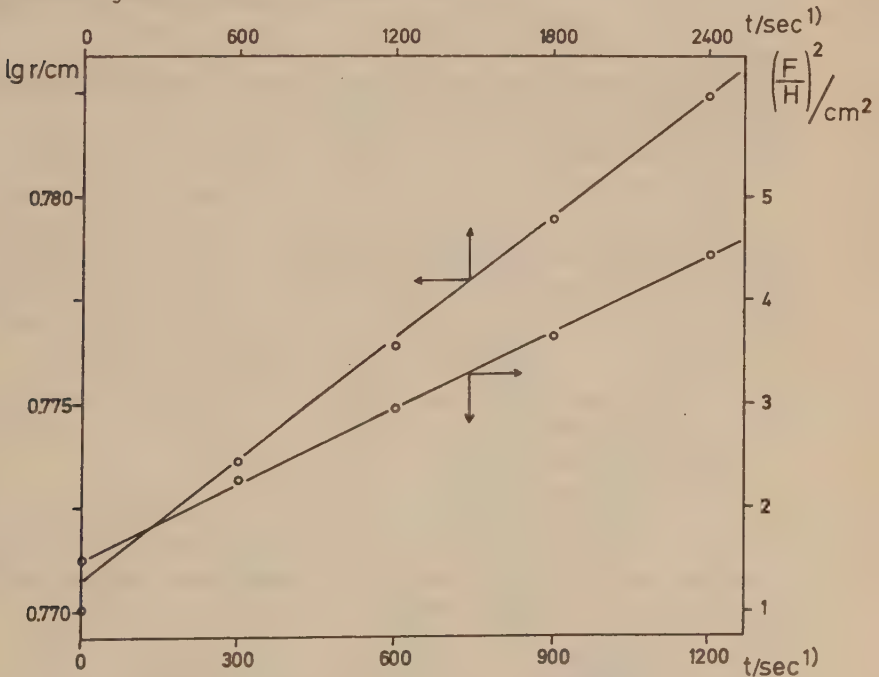


Abb. 26: Darstellung der Geraden zur Berechnung des Sedimentationskoeffizienten nach Gleichung (6) (linke Ordinate und obere Abszisse) und des Diffusionskoeffizienten nach Gleichung (12) (rechte Ordinate und untere Abszisse). Die Meßpunkte sind den Aufnahmen in Abb. 21 entnommen (PT 12).

¹⁾ Nach den geltenden gesetzlichen Bestimmungen ist als Symbol für die Basisgröße "Zeit" ein "s" vorgeschrieben (Gesetz- und Verordnungsblatt für Berlin 25 (1969)951). Da aber das gleiche Symbol für die Sedimentationskonstante verwendet wird, wurde, um Verwechslungen vorzubeugen, entgegen den geltenden Gesetzen die Zeit mit "sec" bezeichnet.

Auch der Diffusionskoeffizient wurde mittels der Ultrazentrifuge bestimmt. Dazu wurden die Lösung der zu untersuchenden Substanz und das Lösungsmittel überschichtet und die Diffusion über die Änderung des Brechungsindexgradienten mittels einer Schlierenoptik verfolgt. Obwohl die Diffusionsmessungen in einer analytischen Ultrazentrifuge durchgeführt wurden, können Kopplungen mit Sedimentationsvorgängen vernachlässigt werden, da nur mit einer geringen Rotorfrequenz gearbeitet worden ist. Die Berechnung des Diffusionskoeffizienten D erfolgte nach Gleichungen, die aus dem zweiten Fick'schen Gesetz abgeleitet worden sind. Für einfache Diffusionsvorgänge und bei konzentrationsunabhängigen Diffusionskoeffizienten gilt

$$\frac{\partial c_2}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c_2}{\partial x^2} \quad (c_2: \text{Konzentration des Gelösten})$$

Unter den Versuchsbedingungen, wie sie in einer Ultrazentrifuge vorliegen, erhält man als Lösung der Differentialgleichung

$$(8) \quad c_2 = \frac{c_{02}}{2} \left(1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^y e^{-y^2} dy \right) \quad y = \frac{x}{2\sqrt{Dt}}$$

c_{02} ist die Anfangskonzentration des gelösten Stoffes, x die Ortskoordinate, t die Zeit.

Aus Gleichung (8) erhält man durch Differenziation

$$\frac{\partial c_2}{\partial x} = - \frac{c_{02}}{2\sqrt{\pi Dt}} \exp(-x^2/4Dt), \text{ für die Stelle } x = 0 \text{ ergibt sich}$$

$$(9) \quad \left(\frac{\partial c_2}{\partial x} \right)_{x=0} = - \frac{c_{02}}{2\sqrt{\pi Dt}}$$

Nach dem Quadrieren und Umformen von Gleichung 9 erhält man eine Geradengleichung:

$$(10) \quad \left[\frac{c_{02}}{\left(\frac{\partial c_2}{\partial x} \right)_{x=0}} \right]^2 = 4 \pi Dt$$

Die Größen c_{02} und $(dc_2/dx)_{x=0}$ werden durch die Auswertung der mit der Schlierenoptik gemachten Aufnahmen bestimmt. Über die Beziehung

$\frac{dn}{dx} = \frac{dn}{dc} \cdot \frac{dc}{dx}$ erhält man die Gleichung

$$(11) \quad \left(\frac{dc}{dx} \right)_{x=0} = \frac{1}{dn/dc} H_{\max} \quad \text{und} \quad (12) \quad c_0 = \frac{1}{dn/dc} F.$$

Dabei sind $H_{\max}$ die Höhe des Peaks und F dessen Fläche, die z.B. mit Hilfe eines Planimeters leicht bestimmbar ist. Mit den Gleichungen (10), (11) und (12) erhält man

$$(13) \quad \left(\frac{F}{H_{\max}} \right)^2 = 4 \pi D t + b.$$

Die am ungenauesten bestimmbare Größe ist die Zeit t , da nicht genau festgestellt werden kann, zu welchem Zeitpunkt der Überschichtungsvorgang von Probenlösung und Lösungsmittel stattgefunden hat. Daher trägt man $(F/H_{\max})^2$ gegen die Zeit t auf und erhält eine Gerade, die nicht durch den Koordinatenursprung führt. Aus der Steigung $m = 4 \pi D$ der Geraden läßt sich der Diffusionskoeffizient errechnen (s. Abb. 26). Für die Berechnung des partiellen spezifischen Volumens der Konjugate wurde von Gleichung (14) für das Volumen einer ternären Lösung bei konstantem Druck und konstanter Temperatur ausgegangen:

$$(14) \quad v = m_1 \tilde{v}_1 + m_2 \tilde{v}_2 + m_3 \tilde{v}_3$$

Index 1: Lösungsmittel
Index 2: Fremdelektrolyt
Index 3: Polymerelektrolyt

m : Masse, $\tilde{v}$: partielles spezifisches Volumen

Bei einem konstanten Verhältnis m_2/m_1 und mit $m_1+m_2+m_3 = m$,

$w_1+w_2+w_3 = 1$ (w : Massenbruch) und

$$\rho_{\text{binär}} = \frac{m_1 + m_2}{m_1 \tilde{v}_1 + m_2 \tilde{v}_2}$$

($\rho_{\text{binär}}$: Dichte des Gemisches aus Lösungsmittel und Fremdelektrolyt)

erhält man aus Gl. (14)

$$(15) \quad \frac{1}{\varrho} = \frac{1}{\varrho_{\text{bin}}} + (\tilde{v}_3 - \frac{1}{\varrho_{\text{bin}}}) w_3 \quad \text{oder nach } \tilde{v}_3 \text{ aufgelöst}$$

$$(16) \quad \tilde{v}_3 = \frac{1}{\varrho_{\text{bin}}} + \frac{(\frac{1}{\varrho} - \frac{1}{\varrho_{\text{bin}}})}{w_3}$$

$1/\varrho$: reziproke Dichte der Lösung

$1/\varrho_{\text{bin}}$: reziproke Dichte des Lösungsmittels, einer wäßrigen Fremdelektrolythlösung

$\tilde{v}_3$: partielles spezifisches Volumen des jeweils untersuchten Konjugaten.

Die hier auftretenden Dichten des Lösungsmittels und der Lösung wurden mit einem digitalen Dichtemeßgerät ermittelt, das die Dichte des Meßgutes über die Eigenfrequenzänderung eines Biegeschwingers bestimmt, dessen Resonanzfrequenz im leeren und gefüllten Zustand genau gemessen wird.

Die Bestimmung erfolgt nach der Gleichung

$$\varrho = A \cdot T^2 - B, \text{ dabei ist } T = 1/\text{Frequenz}$$

A und B sind Apparatekonstanten, die aus Eichmessungen mit Substanzen bekannter Dichte, hier Luft und destilliertes Wasser, erhalten werden.

Die sehr geringe Abhängigkeit des partiellen spezifischen Volumens makromolekularer Substanzen von der Konzentration wurde vernachlässigt.

Die Bestimmung des Sedimentations- und des Diffusionskoeffizienten entfällt bei der Anwendung der Gleichgewichtsmethode. Diese wird dann angewendet, wenn die Rückdiffusion des Gelösten gegenüber der Sedimentation so groß ist, daß keine Zone in der Lösung entsteht, die frei von gelöster Probe ist.

Wenn im Gleichgewicht die Geschwindigkeiten von Sedimentation und Diffusion gleich groß sind, der Teilchenstrom also Null ist, gilt:

$$0 = s \omega^2 r c - D \frac{dc}{dr}$$

Umgeformt und unter Verwendung von Gleichung (6) wird daraus:

$$\frac{s}{D} = \frac{1}{\omega^2 r c} \frac{dc}{dr} = \frac{M_G (1 - v_G^* \rho_L)}{RT}$$

Man erhält so eine Gleichung für die molare Masse:

$$M_G = \frac{2 RT}{(1 - v_G^* \rho_L) \omega^2} \frac{d \ln c}{d(r^2)}$$

Im Gleichgewicht ist der Ausdruck $d \ln c / d(r^2)$ eine Konstante an jeder Stelle r . Ist das nicht der Fall, so liegt ein Kriterium dafür vor, daß es sich nicht um eine einheitliche Substanz handelt. Ein Beispiel für eine nicht einheitliche Probe zeigt Abb. 27.

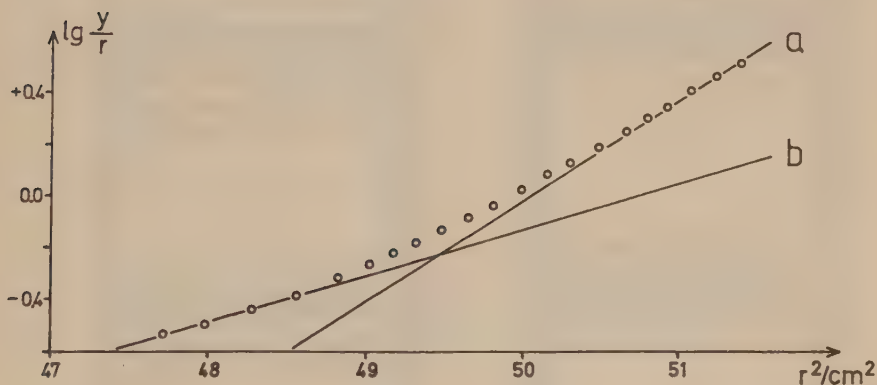


Abb. 27: Auswertung des Sedimentations-Diffusionsgleichgewichts-Laufes der Ultrazentrifuge mit PT 10. Darstellung der Grenzgeraden, aus deren Steigungen die Molmassen 29600 D (b) und 64400 D (a) berechnet worden sind.

Abb. 28 zeigt die zu den Geraden in Abb. 26 dazugehörigen Schlierenaufnahmen des Konjugates PT 12 während des Laufes der Ultrazentrifuge. Im linken Teil der Abbildung sind diejenigen Aufnahmen wiedergegeben, die zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten ausgewertet worden sind. Rechts vom Peak befand sich das Lösungsmittel, auf der anderen Seite

war die Probenlösung. Zu Beginn der Messung lagen die beiden Phasen fast unvermischt nebeneinander vor, erkenntlich an dem schmalen hohen Peak. Im Laufe der Zeit - zeitliche Abfolge der Aufnahmen von oben nach unten - verbreiterte sich der kleiner werdende Peak: durch die Diffusion der gelösten Probe begann an der Phasengrenze der Konzentrationsausgleich. Der rechte Teil von Abb. 28 zeigt die Schlierenaufnahmen, die der Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten dienten. Es ist zu sehen, wie im Laufe der Zeit immer mehr Substanz sedimentiert.

1) Zu S. 137: Die Ordinatenangabe "Radius" bezieht sich hierbei auf die einzelnen Aufnahmen der Meßzellen, die Angabe "Zeit" bezieht sich auf die Abfolge der Aufnahmen

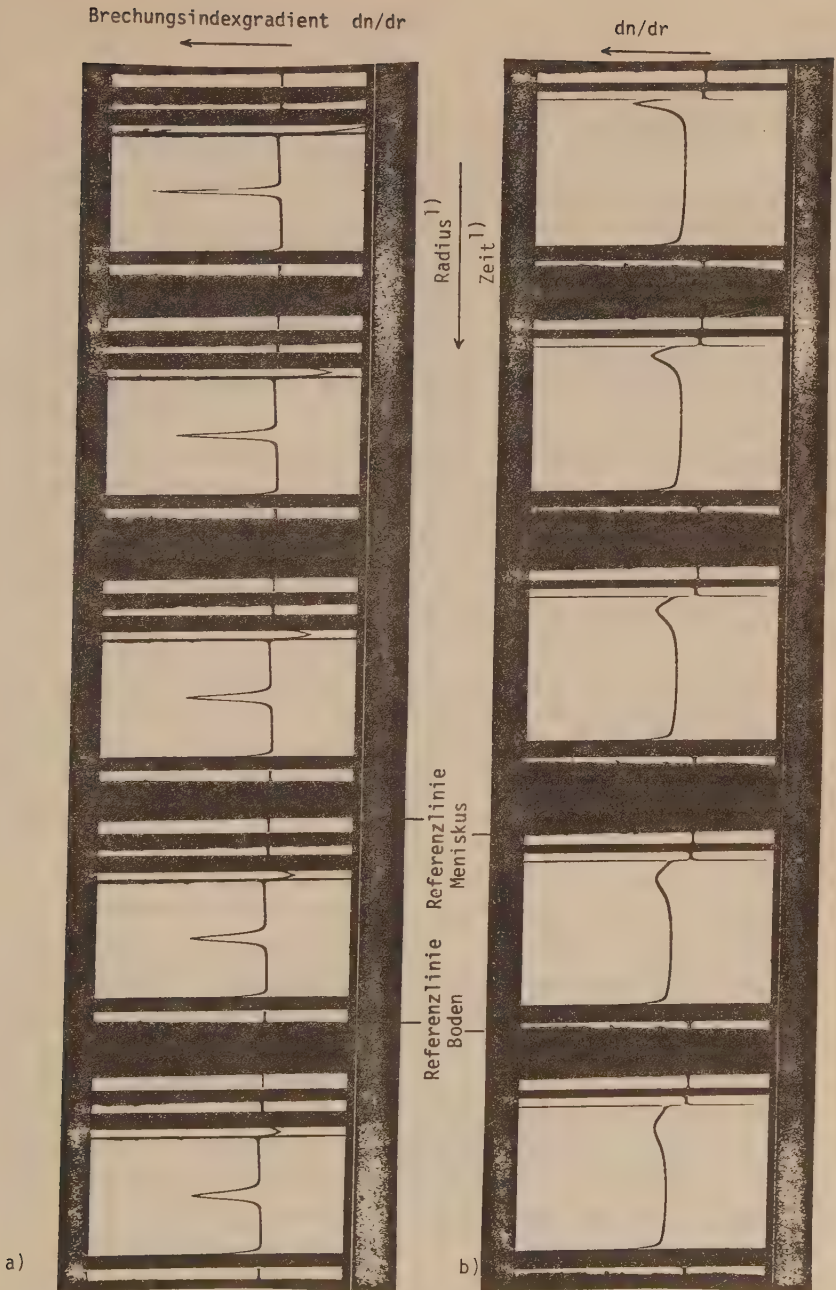


Abb. 28: Schlierenaufnahme von PT 12

a) zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten

b) zur Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten

1) s. S. 136

4. Zusammenfassung

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, wasserlösliche reaktive Polymere darzustellen, die unter milden Bedingungen Enzyme kovalent zu binden vermögen. Solche Konjugate können bei dem Einsatz von Membranreaktoren Anwendung finden. Die Vergrößerung der molaren Massen der Enzyme durch Polymere erlaubt in solchen Fällen die Verwendung von Membranen mit höheren molekularen Ausschlußgrenzen und damit höhere Durchflußgeschwindigkeiten. Daher ist die kovalente Bindung an lösliche Polymere vorwiegend für Enzyme mit niedrigen Molmassen von Interesse. Von besonderer Bedeutung für eine technische Anwendung solcher Konjugate ist die Möglichkeit, sowohl die Thermostabilität als auch die Lagerstabilität von Enzymen durch die Bindung an polymere Träger entscheidend zu verbessern. Damit könnten enzymatisch katalysierte Reaktionen mit längeren Standzeiten bei höheren Temperaturen als bisher durchgeführt werden, wodurch eine kostengünstigere Produktion möglich wäre.

Geeignete Polymere sollten eine aktive Komponente und eine inerte hydrophile Komponente enthalten. Letztere sollte die Polymeren soweit hydrophil machen, daß auch hydrophobe reaktive Gruppen nicht zu unlöslichen Trägern führten. Als inerte hydrophile Komponente wurde das N-Vinylpyrrolidon (NVP) eingesetzt, dessen Homopolymere auch bei hohen molaren Massen noch ausgezeichnet in Wasser löslich sind.

Es wurden mehrere verschiedene lösliche Träger synthetisiert:

Träger 1 war ein Copolymeres des NVP mit Acrylsäure, dargestellt durch eine radikalische Copolymerisation in Lösung. Seine Zusammensetzung wurde durch Elementaranalyse und Titration bestimmt. Die Monomeren sind ungefähr im Verhältnis 1 : 1 eingebaut worden, der Gehalt an Carboxylgruppen betrug 4,9 mVal/g. Mit Hilfe der Ultrazentrifuge wurde eine molare Masse von 12700 g/Mol gefunden. Das Polymere zeigte eine gute Löslichkeit in schwach sauren und alkalischen wäßrigen Lösungen (S. 11). Für die Umsetzung mit Enzymen wurden die Carboxylgruppen mit dem wasserlöslichen 1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (CDI) aktiviert.

Die Träger 2a und 2b wurden durch eine polymeranaloge Umsetzung von Träger 1 dargestellt. Sie waren ebenfalls gut in Wasser löslich. In Träger 2a waren die Carboxylgruppen mit N-Hydroxysuccinimid verestert. Der Gehalt an Succinimidestergruppen wurde nach Hydrolyse und Komplexbildung mit Fe^{3+} -Ionen photometrisch bestimmt. Er betrug 0,25 mmol/g Träger 2a. Die Estergruppen reagierten in neutraler bis schwach alkalischer Lösung mit Enzymen. Der Vorteil dieser Methode der kovalenten Bindung von Eiweiß gegenüber derjenigen mit Carbodiimid lag darin, daß Nebenreaktionen des Enzyms mit der Kupplungskomponente nicht möglich waren (S. 12).

In Träger 2b sind durch die Umsetzung des Trägers 1 mit Triäthylentramin und CDI zusätzlich zu den Carboxylgruppen noch Aminogruppen als reaktive Gruppen in das Polymere eingeführt worden. Weiterhin sollte durch diese Reaktion eine leichte Vernetzung des Trägers 1 und damit eine höhere molare Masse erreicht werden. Die strukturelle Zusammensetzung des Trägers 2b wurde mittels Elementaranalyse bestimmt. Danach hatte jede siebente Carboxylgruppe mit dem Amin reagiert. Der Anteil der salzartig gebundenen Aminmoleküle war dabei gering. Als Molmasse des Trägers 2b wurden mit der Ultrazentrifuge 11700 g/mol gefunden. Demnach ist es nicht gelungen, Moleküle des Trägers 1 zu vernetzen. Die Reaktion des Trägers 2b mit Trypsin verlief wie bei Träger 1 in Gegenwart von CDI (S. 15).

Die Polymeren 3, 4 und 5 waren Copolymere des NVP mit unterschiedlichen Gehalten an Vinylalkohol, dargestellt aus den entsprechenden Vinylacetat-Copolymeren. Die Polymerisation erfolgte radikalisch in Substanz. Die Zusammensetzung der Polymeren wurde elementaranalytisch bestimmt, sie war ungefähr die gleiche wie im Reaktionsansatz. Die Acetatgruppen wurden durch eine alkalische Hydrolyse abgespalten. Danach enthielt Polymer 3 42 Mol% Vinylalkohol-Einheiten, Polymer 4 74 Mol% und Polymer 5 nur 32 Mol% Vinylalkohol-Einheiten. Von Polymer 4 und dessen Acetat wurden mittels der Ultrazentrifuge die molaren Massen bestimmt. Es wurden für das Acetat 131400 g/mol und für den Alkohol 120200 g/mol gefunden (S. 18).

Die Polymeren 4 und 5 wurden durch polymeranaloge Umsetzungen in Träger überführt, die aromatische Aminogruppen aufwiesen, die zu Diazoniumgruppen umgesetzt werden konnten. Dazu wurde das Polymere 4 durch eine Umacetalisierung mit 2-(3-Aminophenyl)-1,3-dioxolan modifiziert. Für die Träger 4a - c wurden mittels einer optischen Bestimmung zwischen 0,23 und 0,37 mmol Dioxolangruppen/g Polymeres gefunden. Da die Umacetalisierung in Gegenwart von Salzsäure durchgeführt wurde, war es möglich, daß die Pyrrolidonringe des NVP hydrolysiert wurden. Zur Untersuchung, ob eine solche Hydrolyse stattgefunden hatte, wurde Träger 4a mit p-Nitrophenol und CDI umgesetzt. Im Falle einer Hydrolyse des NVP wären Carboxylgruppen entstanden, deren p-Nitrophenylester in einem Pyrolyse-massenspektrum charakteristische Peaks ergeben hätte. Derartige Peaks wurden nicht beobachtet. Demnach sind die Pyrrolidonringe nicht in nennenswertem Umfange gespalten worden (S. 22).

Die Bindung von Enzym erfolgte nach der Umsetzung der Aminogruppen der Träger 4a - c zu Diazoniumgruppen. Da die Umacetalisierung vermutlich auch zu Vernetzungsreaktionen geführt hat, waren die Träger 4a - c nur noch schlecht löslich und daher hier für Umsetzungen mit Enzymen wenig geeignet.

Das Polymere 5 wurde einer Umesterung mit dem Methylester der p-Aminosalicylsäure unterzogen. In den Trägern 5a - c wurden nach der Reaktion mittels einer photometrischen Bestimmung nur kleine Mengen an Estergruppen gefunden. Die Träger enthielten 0,45 - 1,47 Gew.% Aminosalicylsäuregruppen, entsprechend 27 - 88 $\mu\text{mol/g}$ (S. 24). Die Aktivierung der Träger erfolgte wiederum durch die Umsetzung der Aminogruppe zu einer Diazoniumgruppe.

Für die Darstellung der Polymeren 6a - c wurden NVP und Acrylsäure-äthylester in Lösung radikalisch copolymerisiert. Die Zusammensetzung der Polymeren wurde elementaranalytisch bestimmt. Sie enthielten zwischen 5 und 17 Mol% Estergruppen. Diese wurden einer Hydrazinolyse unterworfen. Die polymeren Hydrazide (Träger 6a - c) waren nur noch langsam in Wasser löslich, da vermutlich trotz eines sehr großen Hydrazinüberschusses Vernetzungsreaktionen stattgefunden hatten. Die Bindung von Enzym erfolgte auch hier mit CDI als Kupplungskomponente. Aufgrund der schlechten Löslichkeit dieser Träger und auch der von ihnen abgeleiteten Azide wurden sie nach einigen Umsetzungen mit Trypsin nicht weiterverwendet (S. 26).

Träger 7 wurde durch die Copolymerisation von NVP und p-Aminostyrol dargestellt. Dabei war es erforderlich, das NVP vorzupolymerisieren. Ohne diese Vorpolymerisation sind im wesentlichen Homopolymere des p-Aminostyrols in geringer Ausbeute erhalten worden.

Die Zusammensetzung des Trägers wurde photometrisch und elementaranalytisch bestimmt, wobei der zweite Weg wegen des ähnlichen Stickstoffgehaltes der beiden Comonomeren nur eine ungenaue Bestimmung zuließ. Es wurden 11 Mol% p-Aminostyrol gefunden. Mit Hilfe der Pyrolysemassenspektroskopie wurde versucht, Informationen über die Verteilung der Monomeren im Polymeren zu erhalten. Es wurde gefunden, daß trotz eines NVP-Gehaltes im Polymeren von 89 Mol% Fragmente mit bis zu drei Styroleinheiten auftraten, eine Folge der wesentlich besseren Polymerisierbarkeit des Styrols (s. 29). Die kovalente Bindung von Enzym erfolgte auch hier über Diazoniumgruppen.

An die oben beschriebenen Träger wurden drei verschiedene Enzyme kovalent gebunden: die Hydrolasen Trypsin (E.C. 3.4.21.4) und Aminoacylase (E.C. 3.5.1.14) sowie die Oxidoreduktase Peroxidase (E.C. 1.11.1.7). Die Molmassen der Enzyme sind 23500 g/mol für Trypsin, 42000 g/mol für Peroxidase und 86000 g/mol für Aminocylase. Von den enzymhaltigen Konjugaten wurden jene mit Trypsin am eingehendsten untersucht. Da Trypsin als Protease im Gegensatz zu den anderen Enzymen auch durch Autolyse denaturiert werden kann, sollte hier der stabilisierende Effekt durch die kovalente Bindung an Polymere besonders gut zu beobachten sein.

Von Träger 1, einem NVP/Acrylsäure-Copolymeren, und Trypsin wurden etliche Konjugate dargestellt, um die Abhängigkeit ihrer Eigenschaften von den Kupplungsbedingungen zu untersuchen. Dazu wurden die Massenverhältnisse der Komponenten Träger, Carbodiimid und Enzym, die Reaktionszeit und der Reaktions-pH variiert (S. 34). Die Isolierung der Konjugate erfolgte durch eine Fällung mit Ammoniumsulfat und eine anschließende Ultrafiltration durch asymmetrische Membranen mit den Ausschlußgrenzen 50000 D und 100000 D (S. 37). Zum Nachweis von möglichen Verunreinigungen der Produkte durch ungebundenes natives Enzym wurde die Elektrofokussierung herangezogen, die hier besonders günstig war, weil die isoelektrischen Punkte der Konjugate mit dem sauren Träger 1 und des nativen Trypsins weit auseinanderlagen (S. 41).

Der Eiweißgehalt der Konjugate war nur von dem Massenverhältnis der Komponenten im Ansatz abhängig. Er wurde mit Hilfe der Derivativspektroskopie bestimmt. Dazu wurde die zweite Ableitung des Peaks der aromatischen Aminosäuren des Trypsins, der sein Maximum bei 276 nm hat, aufgezeichnet. Durch die zweite Ableitung wurde der Untergrund eliminiert, der durch den polymeren Träger verursacht wurde. Eine Eichung, für die zwei eng benachbarte Extrema des Ableitungsspektrums herangezogen wurden, ergab eine Gerade für den Bereich von 0,03 mg Trypsin/ml bis über 0,3 mg/ml. Ein Vergleich mit einem elementaranalytisch gewonnenen Wert ergab eine gute Übereinstimmung. Es wurden Enzymgehalte von 10 - 50 Gew.% gefunden, je nach der Einwaage an Trypsin im Reaktionsansatz (S. 43).

Von einigen (Träger 1/Trypsin)-Konjugaten wurden die molaren Massen mit Hilfe der Ultrazentrifuge bestimmt (S. 68). Zur Berechnung der Molmassen wurden die Sedimentationskoeffizienten s , die Diffusionskoeffizienten D und die partiellen spezifischen Volumina der Konjugate bestimmt. Dabei wurde gefunden, daß mit steigendem Enzymgehalt auch die molaren Massen anstiegen. Die Werte lagen zwischen 40000 und 120000 g/mol. Diese Molmassen sind Mittelwerte, an deren Bildung auch kleinere Moleküle beteiligt sind. Daher ist es nicht ohne weiteres möglich anzugeben, aus wievielen Molekülen Trypsin und Träger 1 die Konjugate aufgebaut sind. Das gilt insbesondere für die Konjugate mit kleinen Molmassen. Bei den Konjugaten mit den Molmassen 100000 - 120000 D und einem Eiweißgehalt von ca. 40 Gew.% ließ sich für ein "mittleres" Molekül angeben, daß je 2 Trypsinmoleküle mit 5-6 Polymermolekülen verknüpft sind. Eines der untersuchten Konjugate wurde einer zusätzlichen Reinigung durch eine Gelfiltration unterzogen. Dann wurde erneut die molare Masse bestimmt. Diese lag nach der Reinigung um ca. 70 % höher. Da der Eiweißgehalt des gereinigten Produktes höher war als vorher, konnte angenommen werden, daß das Konjugat mit freiem Träger 1 verunreinigt war. Das war ein Resultat der Isolierung der Konjugate durch eine Ammoniumsulfatfällung. Diese Fällung war zwar einfach und schnell durchzuführen, was für praktische Anwendungen sicher von Vorteil ist, sie führte aber auch zu einer Mitfällung unerwünschter Bestandteile des Reaktionsansatzes.

Die Messung der enzymatischen Aktivität des Trypsins und seiner Konjugate erfolgte titrimetrisch und optisch mit N^{α} -Benzoylargininäthylester (BAEE) als Substrat. Die relative Aktivität lag in den meisten Fällen zwischen 35 und 55 %. Dabei zeigten die Konjugate mit einem hohen Enzymgehalt eher geringere relative Aktivitäten. Dieser Zusammenhang wurde auch bei unlöslichen Immobilisaten beobachtet. Er wurde mit der gegenseitigen Hemmung der Beweglichkeit der Enzymmoleküle durch die Bindung an den Träger und Diffusionshemmung des Substrates zum und des Produktes vom Biokatalysator erklärt.

Die Reaktionszeit und der Reaktions-pH bei der Umsetzung des Enzyms mit dem Träger zeigten keinen erkennbaren Einfluß auf die relativen Aktivitäten (S. 46).

Gegenüber Casein als Substrat wurde für ein (Träger 1/Trypsin)-Konjugat (PT 19) eine relative Aktivität von 18,4 % gefunden (S. 51). Von zweien der (Träger 1/Trypsin)-Konjugate - einem eiweißarmen (PT 10) und einem eiweißreichen Konjugat (PT 19) - wurde die Abhängigkeit ihrer Aktivität vom pH-Wert untersucht. Ihr Verhalten war das gleiche wie das des nativen Trypsins. Oberhalb von ca. pH 8 lag das breite Maximum der Aktivität mit einem starken Abfall im schwach sauren Bereich (S. 52).

Von mehreren Konjugaten wurde die Lagerstabilität bei pH 8,5 und Raumtemperatur bzw. bei 5°C untersucht. Es zeigte sich eine deutliche Verbesserung der Stabilität verglichen mit dem nativen Trypsin. Im Falle der Lagerung bei pH 8,5/Raumtemperatur zeigten viele Konjugate nach 100 Stunden noch über 50 % der Anfangsaktivität, während die Aktivität des freien Trypsins auf 5 % abgefallen war. Besonders stabil war das Konjugat PT 19. Es zeigte bei pH 8,5/5°C nach zwei Wochen noch ca. 100 % der Anfangsaktivität. Bei gleichen Bedingungen zeigte natives Trypsin nur noch ca. 10 % der Anfangsaktivität (S. 55).

Für die Konjugate PT 19 und PT 20 wurde die Thermostabilität bei der Inkubation bei 60°C in wäßriger Lösung (pH 4,7 - 4,8) und in Acetatspuffer (pH 4,9) untersucht. Sie war deutlich erhöht. PT 19 zeigte wieder die besten Ergebnisse. Bei Anwesenheit des Puffers zeigten die

Konjugate und auch das native Trypsin eine höhere Stabilität. Es konnte eindeutig festgestellt werden, daß die kovalente Bindung von Trypsin an einen polymeren Träger zu Konjugaten führte, die eine wesentlich bessere Stabilität als das native Enzym aufwiesen (S. 57).

Diskontinuierliche und kontinuierliche Enzymreaktoren wurden mit PT 19 und zum Vergleich mit nativem Trypsin betrieben (S. 63). Während Trypsin bei dem Betrieb von diskontinuierlichen Enzymreaktoren durch eine Membran der Ausschlußgrenze 50000 D kaum zurückgehalten wurde, blieb bei der höheren Ausschlußgrenze von 100000 D die gesamte Aktivität von PT 19 über 10 Messungen erhalten. Durch eine Membran der Ausschlußgrenze 300000 D wurden während der ersten Reaktorzyklen ca. 45 % der Aktivität von PT 19 ausfiltriert, die verbliebene Aktivität nahm dann nur noch langsam ab. Aktivitätsverluste durch Autolyse wurden bei PT 19 nicht beobachtet, wohingegen das native Trypsin durch Autolyse bei jedem Zyklus ca. 25 % seiner Aktivität verlor. Dieses konnte gezeigt werden, indem eine Membran mit der Ausschlußgrenze 10000 D verwendet wurde, durch die Trypsin nicht herausgebracht werden konnte.

Auch bei dem Betrieb eines kontinuierlichen Enzymreaktors wurden PT 19 und natives Trypsin miteinander verglichen. Die eingesetzte Membran hatte eine molekulare Ausschlußgrenze von 100000 D. Die Aktivität des Trypsins war am Anfang ausreichend, alles angebotene Substrat umzusetzen. Nach einer Stunde begann der Umsetzungsgrad abzufallen, bis nach fünf Stunden nur noch ca. 20 % des Substrates umgesetzt wurden. Dieser Umsetzungsgrad blieb erhalten, da das verbliebene aktive Trypsin an der Membran adsorbiert und damit stabilisiert worden ist. Eine Probe von PT 19 mit der gleichen Anfangsaktivität zeigte nach 24 Stunden noch keine Verluste an Aktivität. Somit war das Konjugat PT 19 dem nativen Trypsin in beiden Reaktortypen deutlich überlegen.

Unter den Bedingungen der Kupplung von Trypsin an Träger 1 wurde auch Trypsin alleine mit CDI umgesetzt, um zu untersuchen, ob Vernetzungen der Enzymmoleküle ebenfalls zu einer erhöhten Enzymstabilität führen. Ein mit geringer Ausbeute erhaltenes Produkt zeigte nur eine sehr schlechte Stabilität, so daß die beschriebenen Stabilisierungseffekte bei Trypsin auf die Bindung an den polymeren Träger zurückzuführen sind (S. 73).

Die Konjugate von Träger 2a (NVP/Acrylsäure-Copolymeres - Träger 1 - verestert mit N-Hydroxysuccinimid) mit Trypsin zeigten ein ähnliches Verhalten wie die von Träger 1. Die Umsetzungszeiten betrugen 1 bzw. 20 Stunden, wobei keine wesentlichen Unterschiede zu der Zusammensetzung und den Eigenschaften ähnlicher Konjugate mit Träger 1 gefunden wurden. Die relativen Aktivitäten lagen zwischen 40 und 50 %. Nur die Lagerstabilität bei pH 8,5 und Raumtemperatur lag deutlich höher als die der entsprechenden Konjugate von Träger 1. Nach einer Woche Lagerung waren noch fast 80 % der Anfangsaktivität erhalten, nach zwei Wochen noch 67 %. Für die entsprechenden Konjugate mit Träger 1 wurden bereits nach einer Woche zwischen 40 und 60 % der Anfangsaktivität gefunden (S. 74).

Auch die Konjugate von Träger 2b (Träger 1, umgesetzt mit Triäthylentetramin) und Trypsin verhielten sich ähnlich wie die Konjugate mit Träger 1. Da Träger 2b sowohl Carboxylgruppen als auch Aminogruppen enthielt, neigten die Reaktionsansätze zu Vernetzungsreaktionen, so daß Schwierigkeiten bezüglich der Löslichkeit der Konjugate auftraten. Diese waren nach der Gefriertrocknung teilweise kaum noch in Wasser löslich (S. 78). Eben solche Schwierigkeiten traten auch bei den (Träger 6/Trypsin)-Konjugaten auf (Träger 6a - c : NVP-haltige Copolymere mit Acrylsäurehydrazid-Einheiten). Die schlechte Löslichkeit der Träger wurde durch die Bindung mit dem hydrophilen Enzym nicht verbessert. Die Konjugate waren kaum in Wasser löslich. Die Aktivitäten lagen niedrig und eine Bestimmung des Eiweißgehaltes mit optischen Methoden und mit der Folin-Probe war nicht möglich (S. 79).

Es wurde ebenfalls die Peroxidase (POD) kovalent an Träger 1 gebunden. Die Kupplungsreaktionen fanden bei pH 4 bzw. pH 6 statt, die Reaktionszeiten betrugen 1 bzw. 2 Tage (S. 83). Die Isolierung der Konjugate mittels einer Fällung mit Ammoniumsulfat führte in keinem Falle zu Produkten, die frei von nativem Enzym waren, was mit Hilfe der analytischen Elektrofokussierung festgestellt wurde. Da die präparative Elektrofokussierung zu einer Inaktivierung des gebundenen Enzyms führte, wurden die Reaktionsprodukte an Sephadex G-100 gereinigt. Die Konjugate durchwanderten die Gelsäule im Ausschlußvolumen. Ihre molaren Massen waren danach größer als 150000 D (S. 84).

Der Eiweißgehalt lag in allen Fällen bei nur 3-13 %. Er wurde optisch bestimmt, indem die Extinktion der Soret-Bande des Häm-systems des Enzyms gemessen wurde (S. 88). Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität erfolgte optisch mit 2,2'-Azino-di-(3-äthyl-benzthiazolin-sulfonsäure-6) (ABTS) und Wasserstoffperoxid als Substrate. Konjugate mit etwa gleichem Eiweißgehalt zeigten hier große Unterschiede in ihren relativen Aktivitäten. Diese lagen zwischen 2 und 28 % bei den Konjugaten, die bei pH 4 und zwischen 50 und 88 % bei denjenigen, die bei pH 6 dargestellt wurden (S. 90).

Die Thermostabilität bei 60°C von drei (Träger 1/POD)-Konjugaten wurde mit derjenigen des nativen Enzyms verglichen. Obwohl die native POD thermisch schon relativ stabil ist, konnte durch die kovalente Bindung des Enzyms an einen polymeren Träger eine Verbesserung der Thermostabilität erreicht werden. Im günstigsten Falle waren nach fünfstündiger Inkubation bei 60°C noch über 80 % der Anfangsaktivität erhalten gegenüber ca. 50 % bei dem nativen Enzym (S. 92).

Ein Versuch zur Reaktion von POD mit CDI in Abwesenheit von Träger 1 ergab kein Umsetzungsprodukt (S. 94).

Auch die Träger 4a (NVP/Vinylalkohol-Copolymeres, umgesetzt mit 2-(3-Aminophenyl)-1,3-dioxolan), 5a - c (NVP/Vinylalkohol-Copolymeres, verestert mit p-Aminosalicylsäure) und 7 (NVP/p-Aminostyrol-Copolymeres) sind zur Bindung von POD herangezogen worden. Während bei Kupplungsreaktionen mit Träger 4a ein niedermolekulares Phenol als Kupplungsabbrecher zugesetzt werden mußte, um Vernetzungen der Konjugate zu verhindern, war ein solcher Zusatz bei den Trägern 5a - c und 7 nicht erforderlich. Aufgrund der schlechten Löslichkeit der mit den oben genannten Trägern erhaltenen Konjugate wurden diese nicht getrocknet, sondern als Lösung in dem Puffer untersucht, in dem sie bei der gelchromatographischen Reinigung anfielen (S. 94).

Die enzymatischen Aktivitäten dieser Konjugate lagen im allgemeinen zwischen 0,4 und 1,0 U/mg Konjugat. Die relativen Aktivitäten konnten nicht bestimmt werden, da es nicht möglich war, Aussagen über den Enzymgehalt zu machen. Das durch die Diazoniumkupplung der POD neu entstandene

chromophore System überlagerte die Soret-Bande, so daß quantitative Messungen nicht mehr möglich waren. Auch mit längerwelligen Absorptionen von Derivaten der POD waren Messungen nicht erfolgreich. Die Versuche zur Bestimmung des Eiweißgehaltes über den Eisengehalt der POD-haltigen Konjugate waren erfolglos. Ebenso wenig war die Folinreaktion anwendbar, da auch die polymeren Träger eine Färbung des Reagenz' bewirkten (S. 96).

Da die an die Träger 4a und 5a - c gebundene POD mit Wasserstoffperoxid kein Derivat ergab, wurde vermutet, daß die Konjugate eine erhöhte Stabilität gegenüber diesem Reagenz zeigen. Diese Vermutung hat sich nicht bestätigt. Unterschiede der Stabilität von nativer und trägergebundener POD wurden in diesem Falle nicht gefunden (S. 99).

Als drittes Enzym ist die Aminoacylase zur kovalenten Bindung an reaktive wasserlösliche Träger herangezogen worden. Bei allen Konjugaten zeigte sich eine verminderte Löslichkeit. Sie waren bis auf wenige Ausnahmen nach einer Gefrier Trocknung nur noch teilweise in Wasser löslich, so daß im Verlaufe der Arbeit nach Möglichkeit auf eine Trocknung verzichtet wurde. Die Lagerung in Lösung schränkte die Haltbarkeit der Konjugate allerdings ein. Die Reinigung aller dieser Konjugate erfolgte durch Gelchromatographie.

Aminoacylase wurde nach dem gleichen Verfahren mit CDI an Träger 1 gebunden, wie es für Trypsin ausführlich beschrieben worden ist (S. 104). Der Eiweißgehalt der so gewonnenen Konjugate wurde wie bei den trypsinhaltigen Konjugaten mittels der Derivativspektroskopie bestimmt. Er war im wesentlichen von der Menge an eingesetztem Enzym abhängig und lag zwischen 17 und 32 Gew.%. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte mit N-Acetyl-DL-methionin als Substrat. Die stereospezifische Abspaltung der Acetylgruppe aus dem L-Enantiomer wurde polarimetrisch verfolgt. Die relativen Aktivitäten lagen zwischen 11-12 % für Konjugate, die entsalzt und lyophilisiert worden sind, und bei ca. 43 % für ein Konjugat, dessen Kupplungsreaktion in Gegenwart von Cobaltionen stattgefunden hatte und das in Lösung aufbewahrt wurde (S. 105).

Die Lagerstabilität dieses letzten Konjugates war bei pH 8 und Raumtemperatur schlechter als bei dem nativen Enzym, wohingegen es eine höhere Proteolysebeständigkeit zeigte. Während das native Enzym nach sechstägiger Einwirkung von Chymotrypsin inaktiv war, zeigte das Konjugat nach diesem Zeitraum noch 14 % der Anfangsaktivität (S. 107).

Die kovalente Bindung von Aminoacylase mittels einer Diazoniumkupplung an die Träger 4a und 7 führte zu enzymatisch inaktiven Konjugaten (S.108).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß Enzyme durch die kovalente Bindung an wasserlösliche reaktive polymere Träger in stabile wasserlösliche Konjugate übergeführt werden können, die bei einem guten Erhalt der enzymatischen Aktivität eine höhere Stabilität als die nativen Enzyme aufwiesen. Konjugate, die Trypsin enthielten, zeigten aufgrund ihrer deutlich höheren molaren Masse in Membranreaktoren auch bei hohen molekularen Ausschlußgrenzen eine stabile enzymatische Wirksamkeit bei einer wesentlich verbesserten Thermostabilität und Lagerstabilität.

5. Literaturverzeichnis

- 1) G. Manecke, K.E. Gillert, *Naturwissenschaften* 42 (1955) 212
- 2) G. Manecke, *Chimia* 28 (1974) 467
- 3) L. Goldstein, G. Manecke, *Appl. Biochem. Bioeng.* Vol. 1,
(Hrsg. L.B. Wingard, Jr., E. Katchalski-Katzir und L. Goldstein),
Academic Press, New York 1976, S. 23
- 4) G. Manecke, H.-G. Vogt, D. Polakowski, *Makromol. Chem. Suppl.*
3 (1979) 107
- 5) I. Chibata, T. Tosa, in "Applied Biochemistry and Bioengineering"
(Hrsg. L.B. Wingard, Jr., E. Katchalski-Katzir, L. Goldstein),
S. 329, Academic Press, New York, Bd. 1, 1976
- 6) B.P. Sharma, L.F. Bailey, R.A. Messing, *Angew. Chem.* 94 (1982) 836
- 7) R.B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) 2149
- 8) F. Brandstetter, H. Schott, E. Bayer, *Makromol. Chem.* 176 (1975) 2163
- 9) K. Geckeler, E. Bayer, *Liebigs Ann. Chem.* 1975, 1671
- 10) E. Bayer, V. Schurig, *Angew. Chem.* 87 (1975) 484
- 11) E. Bayer, H. Eberhardt, K. Geckeler, *Angew. Makromol. Chem.* 97 (1981)
217
- 12) H. Ringsdorf, *J. Polym. Sci., Symp.* 5 (1975) 135
- 13) W. Kern, W. Herold, B. Scherhag, *Makromol. Chem.* 17 (1955) 231
- 14) T. Okubo, N. Ise, *Adv. Polym. Sci.* 25 (1977) 136
- 15) O. Zaborsky, *Immobilized Enzymes*, CRC Press, Cleveland (Ohio) 1973
- 16) H.H. Weetall, *Chemiker-Ztg.* 97 (1973) 611
- 17) E. Staude, W. Jorisch, *Angew. Makromol. Chem.* 96 (1981) 21
- 18) G. Greco, Jr., L. Gianfreda, *Biotechnol. Bioeng.* 23 (1981) 2199
- 19) M.A. Mitz, L.J. Summaria, *Nature* 189 (1961) 576
- 20) R. Axén, P. Myrin, J. Janson, *Biopolymers* 9 (1970) 401
- 21) J.R. Wykes, P. Dunnill, M.D. Lilly, *Biochim. Biophys. Acta* 250
(1971) 522

- 22) S.P.O'Neill, J.R. Wykes, P. Dunnill, M.D. Lilly, *Biotechnol. Bioeng.* 13 (1971) 319
- 23) L. Kågedal, S. Åkerström, *Acta Chem. Scand* 25 (1971) 1855
- 24) G. Vegarud, T.B. Christensen, *Biotechnol. Bioeng.* 17 (1975) 1391
- 25) B.M. Kurinenko, N.V. Kalacheva, G.K. Gabdullina, *Bioorg. Khim.* 1 (1975) 483 (CA 83 (1975) 93062)
- 26) B.M. Kurinenko, N.V. Kalacheva, G.A. Penzikova, I.F. Shokova, *Biokhimiya* 43 (1978) 1994 (CA 90 (1979) 99241 x)
- 27) J.J. Marshall, M.L. Rabinowitz, *Biotechnol. Bioeng.* 18 (1976) 1325
- 28) J.J. Marshall, J.D. Humphreys, *Biotechnol. Bioeng.* 19 (1977) 1739
- 29) G.M. Lindenbaum, T.I. Bogacheva, O.A. Mirgorodskaya, B.V. Moskvichev, I.M. Tereshin, *Prikl. Biokhim, Mikrobiol.* 13 (1977) 685 (CA 88 (1978) 2417 g)
- 30) R.L. Foster, *Experientia* 31 (1975) 772
- 31) R.R. Reiner, H. Doring, *Enzyme Engeneering* 4 (1978) 111
- 32) H.F. Pfeiffer, R. Schmidt, K. Siekmann, *Ger. Offen.* 2.919.622 20.11.1980 (CA 94 (1981) 12263 s)
- 33) B.U. v.Specht, M. Wahl, H.J. Kolb, W. Brendel, *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 213 (1975) 242
- 34) A. Abuchowski, I.R. McCoy, N.C. Palczuk, T. Van Es, F.F. Davis, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 3578
- 35) F.F. Davis, A. Abuchowski, T. Van Es, N.C. Palczuk, R. Chen, K. Savoca, K. Wieder, *Enzyme Engeneering* 4 (1978) 169
- 36) R. Epton, G. Marr, G.J. Morgan, *Biochem. Soc. Trans.* 5 (1977) 277
- 37) R. Epton, G. Marr, G.J. Morgan, *Polymer* 18 (1977) 319
- 38) B.U. v.Specht, H. Seinfeld, W. Brendel, *Hoppe Seylers' Z. Physiol. Chem.* 354 (1973) 1659
- 39) J.J. Marshall, M.L. Rabinowitz, *J. Biol. Chem.* 251 (1976) 1081
- 40) B. Geiger, B.U. v.Specht, R. Arnon, *Eur. J. Biochem.* 73 (1977) 141
- 41) E. van Leemputten, M. Horisberger, *Biotechnol. Bioeng.* 18 (1976) 587
- 42) U. Klussmann, Diplomarbeit FU Berlin 1979

- 43) S. Emi, D.V. Myers, G.A. Iacobucci, *Biochim. Biophys. Acta* 445 (1976) 672
- 44) B. Solomon, Y. Levin, *Biotechnol. Bioeng.* 16 (1974) 1161
- 45) R.P. Patel, D.L. Lopiekes, S.P. Brown, S. Price, *Biopolymers* 5 (1967) 577
- 46) V. Saudek, J. Drobnik, M. Havranová, D. Čechová, *Makromol. Chem.* 183 (1982) 1473
- 47) M.K. Weibel, C.W. Fuller, J.M. Stadel, A. Buckmann, T. Doyle, H.C. Bright, *Enzyme Engineering* 2 (1973) 203
- 48) P. Zappelli, A. Rossodivita, L. Re, *Eur. J. Biochem.* 54 (1975) 475
- 49) R.W. Coughlin, M. Aizawa, M. Charles, *Biotechnol. Bioeng.* 18 (1976) 199
- 50) Y. Yamazaki, H. Maeda, H. Suzuki, *Biotechnol. Bioeng.* 18 (1976) 1761
- 51) F. LeGoffic, S. Sissic, C. Vinemt, *Biochimie* 60 (1978) 421
- 52) Y. Sakaguchi, J. Endo, T. Murachi, *CA 90*: 134755 s (1979)
Rinsho Kagaku Shimpojumu 17 (1977) 162
- 53) J.R. Wykes, P. Dunnill, M.D. Lilly, *Biochim. Biophys. Acta* 286 (1972) 260
- 54) U. Seitz, H. Paul, *Angew. Makromol. Chem.* 76/77 (1979) 319
- 55) S. Heise, *Diplomarbeit FU Berlin* 1977
- 56) V. Jancsik, T. Keleti, *J. Mol. Catalysis* 6 (1979) 41
- 57) H. Uelzmann, *J. Polymer Sci.* 33 (1958) 377
- 58) G.W. Anderson, J.E. Zimmerman, F.M. Callahan, *J. Am. Chem. Soc.* 86 (1964) 1839
- 59) R.L. Schnaar, Y.Ch. Lee, *Biochemistry* 14 (1975) 1535
- 60) J.G. Pritchard, *Poly(vinylalcohol)*, Gordon and Breach Science Publishers; London, New York, Paris 1970
- 61) J.F. Bork, L.E. Coleman, *J. Polymer Sci.* 43 (1960) 413
- 62) F. Runge, E. Taeger, *Einführung in die Chemie und Technologie der Kunststoffe*, Akademie-Verlag, Berlin 1976, S. 132

- 63) A. Conix, G. Smets, J. Polymer Sci. 15 (1955) 221
- 64) E. Minami, S. Kojima, J. Chem. Soc. Japan, Ind. Chem. Sect. 57 (1954) 826
- 65) H.G. Vogt, Dissertation, FU Berlin 1979
- 66) I.S. Varga, Z. Wolkober, Acta. Chim. Hung. 41 (1964) 431
- 67) W. Kern, T. Hucke, R. Holländer, R. Schneider, Makromol. Chem. 22 (1957) 31
- 68) Wen-Yen Chiang, Ta T'ung Hsueh Pao 4 (1974) 1; CA 81 (1974) 136593 und CA 86 (1977) 140552
- 69) J.D. Semtschikow, A.W. Rjabow, W.N. Kaschajewa, Vysokomol. Soedin., Ser. B, 12 (1970) 381
- 70) F. Runge, E. Taeger, Einführung in die Chemie und Technologie der Kunststoffe, Akademie-Verlag, Berlin 1976, S. 126
- 71) H. Tsuchida, Jpn. Kokai Tokkyo Koho 81 49.713; CA 95 (1981) 133650
- 72) Y. Kurimura, N. Shinozaki, F. Ito, Y. Uratani, K. Shigehara, E. Tsuchida, M. Kaneko, A. Yamada, Bull. Chem. Soc. Jpn. 55 (1982) 380; CA 96 (1982) 173338
- 73) Shi-shyan Pan, H. Morawetz, Macromolecules 13 (1980) 1157
- 74) J.C. Sheehan, G.P. Hess, J. Am. Chem. Soc. 77 (1955) 1067
- 75) Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl), Bd. XV/2, Hrsg. E. Wünsch, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1974, S. 103 ff. und dort zitierte Literatur
- 76) J.C. Sheehan, P.A. Cruickshank, Org. Synth. 48 (1968) 83
- 77) H. Ozawa, Biochemistry 9 (1970) 2158
- 78) T.P. Mate, T.A. Horbett, A.S. Hoffmann, B.D. Ratner, Enzyme Engineering Bd. 2 (Hrsg. E.K. Pye, L.B. Wingard, Jr.) 1973, S. 137
- 79) J.D. Morrison, J. Chem. Phys. 21 (1953) 1767
- 80) A. Schmitt, Schriftenreihe "Angewandte UV-Spektroskopie", Hefte 1 und 3; Hrsg. Bodenseewerk Perkin-Elmer & Co GmbH, 1977
- 81) D.M. Krämer, K. Lehmann, H. Plainier, W. Reisner, B.G. Sprössler, J. Polym. Sci., Polym. Symp. 47 (1974) 77

- 82) A. Bar-Eli, E. Katchalski, J. Biol. Chem. 238 (1963) 1690
- 83) R. Axén, S. Ernback, Eur. J. Biochem. 18 (1971) 351
- 84) J.M. Engasser, C. Horvath, Biochim. Biophys. Acta 358 (1974) 178
- 85) L. Goldstein, M. Pecht, S. Blumberg, D. Atlas, Y. Levin, Biochemistry 9 (1970) 2322
- 86) D. Gabel, V. Kasche, Biochem. Biophys. Res. Commun. 48 (1972) 1011
- 87) T. Svedberg, K.O. Pedersen, Die Ultrazentrifuge, Theodor Steinkopf 1940
- 88) R. Timkovich, Biochem. Biophys. Res. Commun. 74 (1977) 1463
- 89) O. Adalsteinsson, A. Lamotte, R.F. Baddour, C.K. Colton, A. Pollak, G.M. Whitesides, J.Mol. Catal. 6 (1979) 199
- 90) A. Pollak, H. Blumenfeld, M. Wax, R.L. Baughn, G.M. Whitesides, J. Am. Chem. Soc. 102 (1980) 6324
- 91) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, J. Biol. Chem. 193 (1951) 265
- 92) B. Keil, in "The Enzymes, Vol. III", Hrsg. P.D. Boyer, Academic Press, New York. London 1971, S. 249
- 93) H.U. Bergmeyer, "Methoden der enzymatischen Analyse", 3. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße 1974, Bd. 1, S. 526
- 94) I. Yamazaki, K. Yokota, Mol. Cell. Biochem. 2 (1973) 39
- 95) K.G. Paul, T. Stigbrand, Acta Chem. Scand. 24 (1970) 3607
- 96) K.G. Welinder, FEBS-Letters 72 (1976) 19
- 97) P.B. Baker, B.C. Saunders, Tetrahedron 31 (1975) 1869
- 98) G.J. Bartling, Enzyme Technology Grantess-Users Conference, Nat. Sci. Found., Res. Appl. Natl. Needs 1975, S. 55
- 99) J.M. Harkin, J.R. Obst, Science 180 (1973) 296
- 100) A.M. Klivanov, Z. Berman, B.N. Alberti, J. Am. Chem. Soc. 103 (1981) 6263
- 101) B.N. Alberti, A.M. Klivanov, Biotechnol. Bioeng. Symp. 11 (1981) 373
- 102) Gelfiltration in Theory and Practice, Firmenschrift der Pharmacia Fine Chemicals AB, 1980

- 103) P. Andrews, Biochem. J. 96 (1965) 595
- 104) J.R. Whitaker, Anal. Chem. 35 (1963) 1950
- 105) P.I. Ohlsson, K.G. Paul, Acta. Chem. Scand. B 30 (1976) 373
- 106) S. Hünig, H. Balli, H. Conrad, A. Schott, Ann. Chem. 676 (1964) 36
- 107) W. Werner, H.G. Rey, H. Wielinger, Fresenius' Z. Anal. Chem. 252 (1970) 224
- 108) H. Gallati, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17 (1979) 1
- 109) H. Theorell, A.C. Maehly, Acta Chem. Scand. 4 (1950) 422
- 110) K.H. Park, A. Fricker, Z. Ernährungswiss. 16 (1977) 81
- 111) N.N. Ugarova, L.Yu. Brovko, G.D. Rozhkova, I.V. Berezin, Biochemistry 42 (1977) 943 (engl. Übersetzung aus Biokhimija 42 (1977) 1212)
- 112) W.R. Brode, J.H. Gould, G.M. Wyman, J. Am. Chem. Soc. 74 (1952) 4641
- 113) D. Keilin, E.F. Hartree, Biochem. J. 49 (1951) 88
- 114) K.G. Paul, H. Theorell, Å. Åkeson, Acta Chem. Scand. 7 (1953) 1284
- 115) Tschen-U Tsi, V.N. Orechowitsch, Biochimija 23 (1958) 772, CA 53 (1959) 4382
- 116) F.H. Bruns, C. Schulze, Biochem. Z. 336 (1962) 162
- 117) W. Kördel, F. Schneider, Biochim. Biophys. Acta 445 (1976) 446
- 118) W. Kördel, F. Schneider, Z. Naturforsch. 32c (1977) 337 und 342
- 119) B. Szajáni, K. Ivony, L. Boross, Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 15 (1980) 295
- 120) B. Szajáni, K. Ivony, L. Boross, J. Appl. Biochem. 2 (1980) 72
- 121) C. Wandrey, Chem.-Ing.-Tech. 48 (1976) 537
- 122) J. van Alphen, Rec. trav. chim. 55 (1936) 412; CA 30 (1936) 5992
- 123) E.L. Forman, S.M. McElvain, J. Am. Chem. Soc. 62 (1940) 1435
- 124) W.H. Saunders, R.A. Williams, J. Am. Chem. Soc. 79 (1957) 3716
- 125) H. Wislicenus, L. Kaufmann, Chem. Ber. 28 (1895) 1325
- 126) J.H. Boyer, H. Alul, J. Am. Chem. Soc. 81 (1959) 2137

- 127) A.M. Shur, N.A. Barba, Uch. Zap. Kishinevsk. Gos. Univ. 68 (1964) 79; CA 64 (1966) 3383
- 128) A. Winter, K. Ek, U.-B. Anderson, LKB Application Note 250, Dezember 1977
- 129) J.F. Kêzdy, L. Lorand, K.D. Miller, Biochemistry 4 (1965) 2302
- 130) H.G. Elias, Theorie und Praxis der Ultrazentrifugentechnik, Beckmann Instruments GmbH, München

Lebenslauf

Am 25.10.1950 wurde ich, Stefan Heise, als Sohn des Rechtsanwaltes Claus Heise und seiner Frau Maria, geb. v.Kotze, in Berlin-Spandau geboren.

Von 1957 bis 1963 besuchte ich die Kronach-Grundschule und ab 1963 das Lilienthal-Gymnasium, beide in Berlin-Lichterfelde. Im Januar 1970 legte ich die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1970 wurde ich an der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Freien Universität Berlin im Fach Chemie immatrikuliert. Nach der im Juni 1975 bestandenen Diplomhauptprüfung begann ich am Institut für Organische Chemie der Freien Universität Berlin unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. G. Manecke meine Diplomarbeit mit dem Thema "Wasserlösliche reaktive polymere Träger zur kovalenten Bindung von Enzymen".

Ab 1977 fertigte ich neben meiner Tätigkeit als Assistent im Institut für Organische Chemie die vorliegende Dissertation an.

Seit Mai 1983 bin ich im Rahmen des Forschungsvorhabens "Immobilisierung multifunktionaler Enzymsysteme" des Bundesministers für Forschung und Technologie tätig.

1976 heiratete ich die Krankenschwester Jutta, geb. Hugo, wir haben drei Kinder.

Erst wenn der letzte Baum gerodet,
der letzte Fisch gefangen,
der letzte Fluß vergiftet ist,
werdet ihr feststellen,
daß man Geld nicht essen kann.

